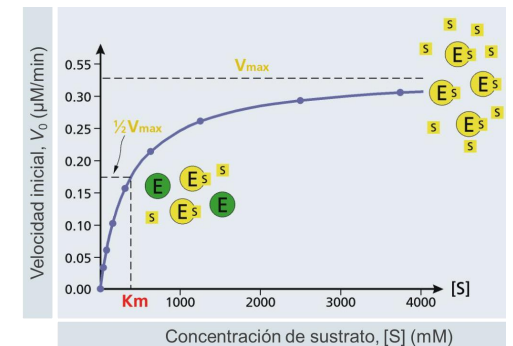


CINÉTICA ENZIMÁTICA

Módulo 1

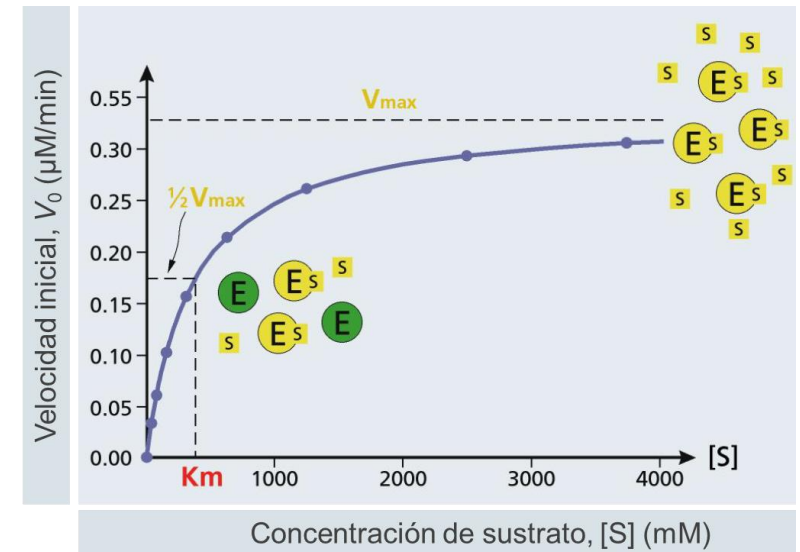
Bioquímica I
2026



DEFINICIÓN

¿Que entendemos por cinética enzimática?

- ✓ Es el estudio de la velocidad de las reacciones catalizadas por enzimas y los factores que afectan esta velocidad.
- ✓ Investiga cómo cambia la velocidad de una reacción enzimática en respuesta a la variación de la concentración de sustrato, la concentración de enzima y otros factores ambientales como la temperatura y el pH.



VELOCIDAD DE REACCIÓN

➤ La velocidad de una reacción indica cómo varía la concentración de reactivos o productos con el tiempo

➤ Ejemplo:
Para la reacción

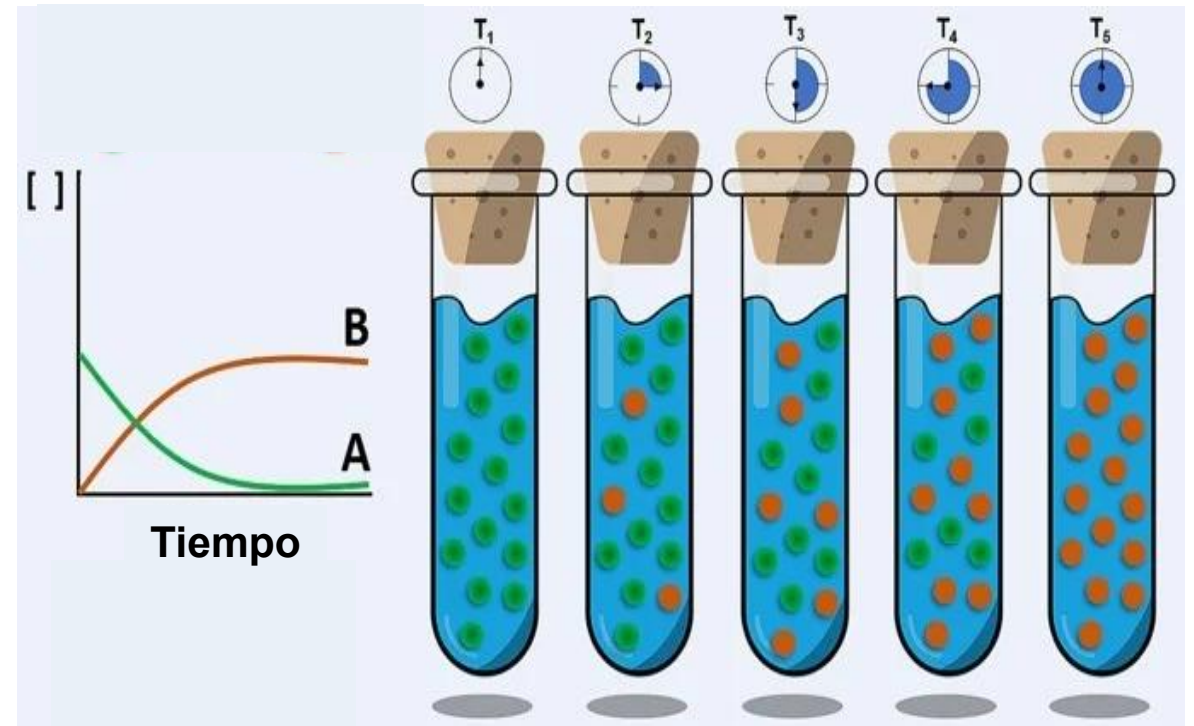


➤ La velocidad de la reacción se puede expresar:

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = \frac{d[B]}{dt}$$

$$v = k[A]$$

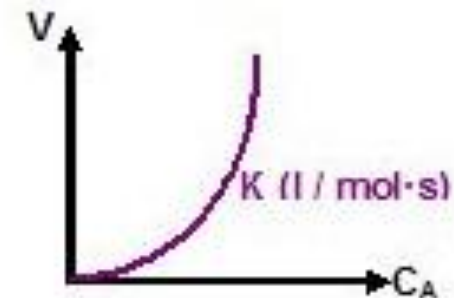
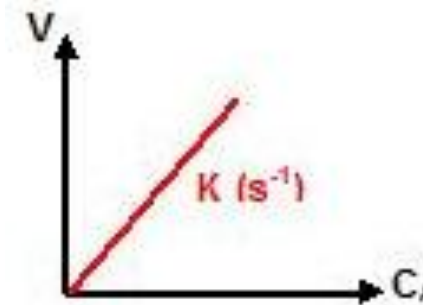
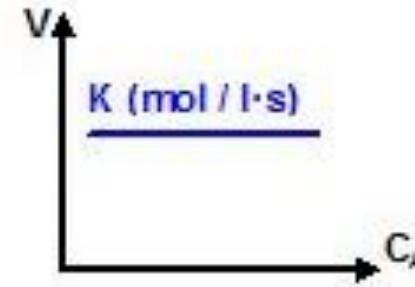
➤ Donde k es la constante de velocidad



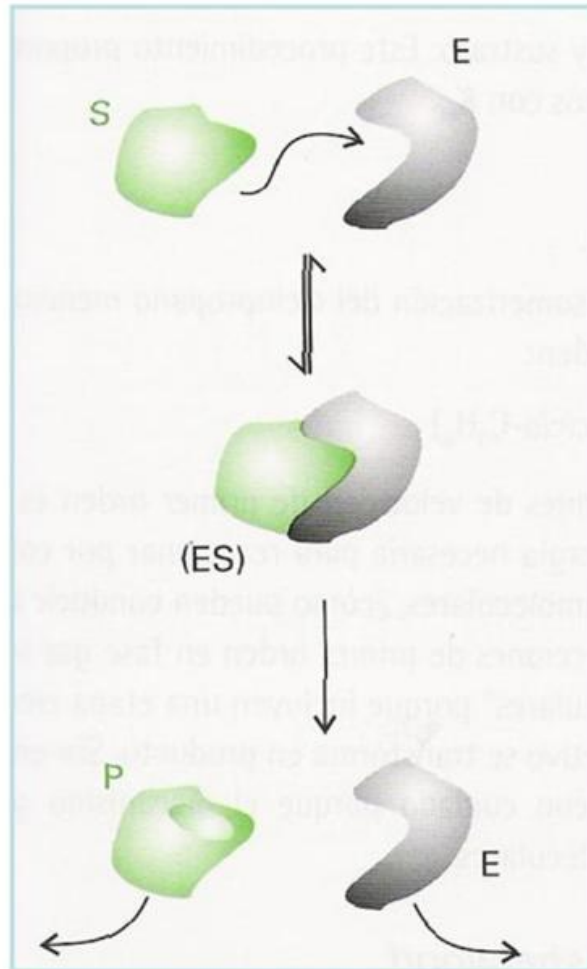
Actividad determinada a una concentración fija de enzima y de sustrato

ORDEN DE REACCION RESPECTO A LA CONCENTRACION DE SUSTRATO

Orden	Ecuación	Velocidad de formación del producto
cero	$v = k$ $k = \text{M} \cdot \text{s}^{-1}$	es independiente de la concentración de sustrato
primer	$v = k [A]$ $k = \text{s}^{-1}$	es directamente proporcional a la concentración del sustrato
segundo	$v = k [A_1] [A_2]$ $k = \text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ $v = k [A]^2$	depende de la conc. de dos sustratos del cuadrado o de la concentración de un único sustrato



La cinética enzimática



Leonor Michaelis
1875–1949



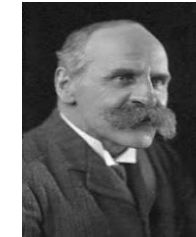
Maud Menten
1879–1960



Victor Henri
1872–1940



George Edward Briggs
1893–1985



J. B. S. Haldane
1892–1964

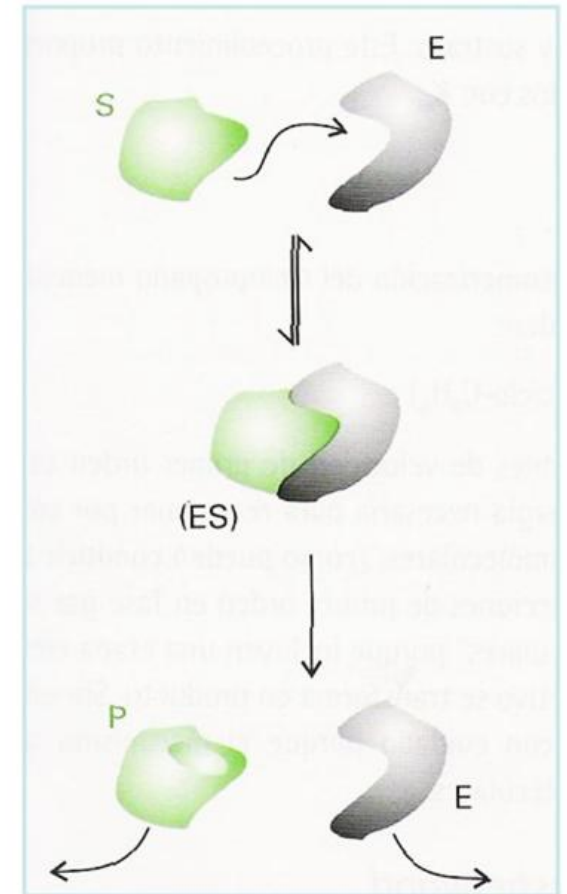
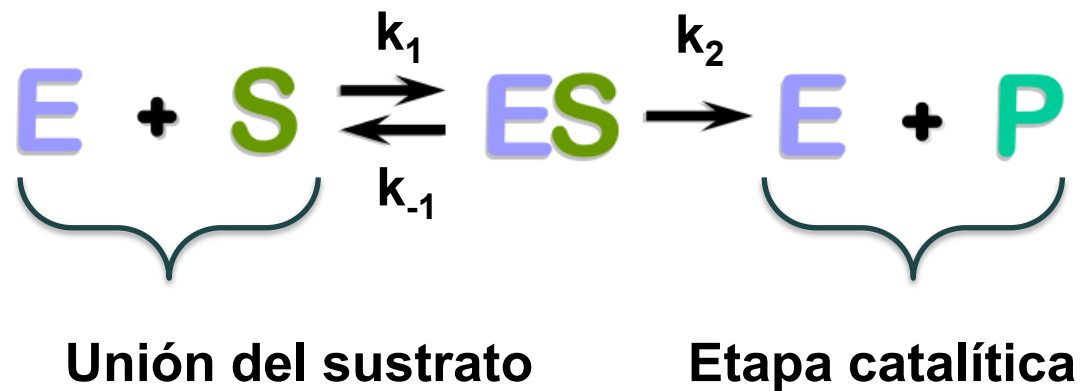
$$V = \frac{V_{\text{máx}}[S]}{K_M + [S]}$$

MODELO CINÉTICO DE MICHAELIS-MENTEN (1913)

- Modelo matemático sencillo que explica las propiedades cinéticas de muchas enzimas.
- Reacciones catalizadas enzimáticamente ocurren **en dos etapas**:

- ✓ **Formación del complejo enzima-sustrato**

- ✓ **Formación del producto**

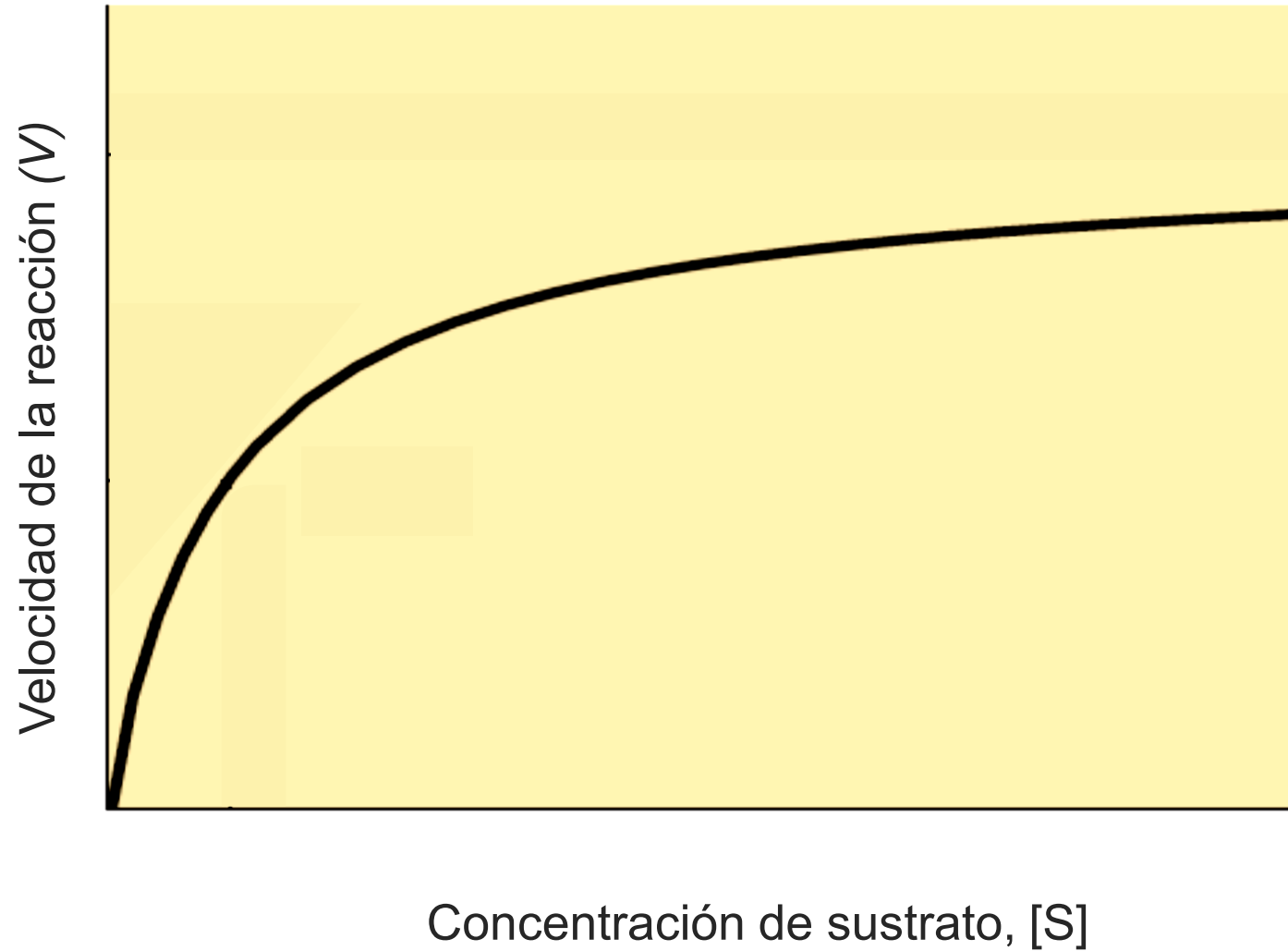


Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de la reacción

- Para estudiar la cinética enzimática se mide el **efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción**, manteniendo la cantidad de enzima constante

Comportamiento cinético de enzimas

(Henri 1903)

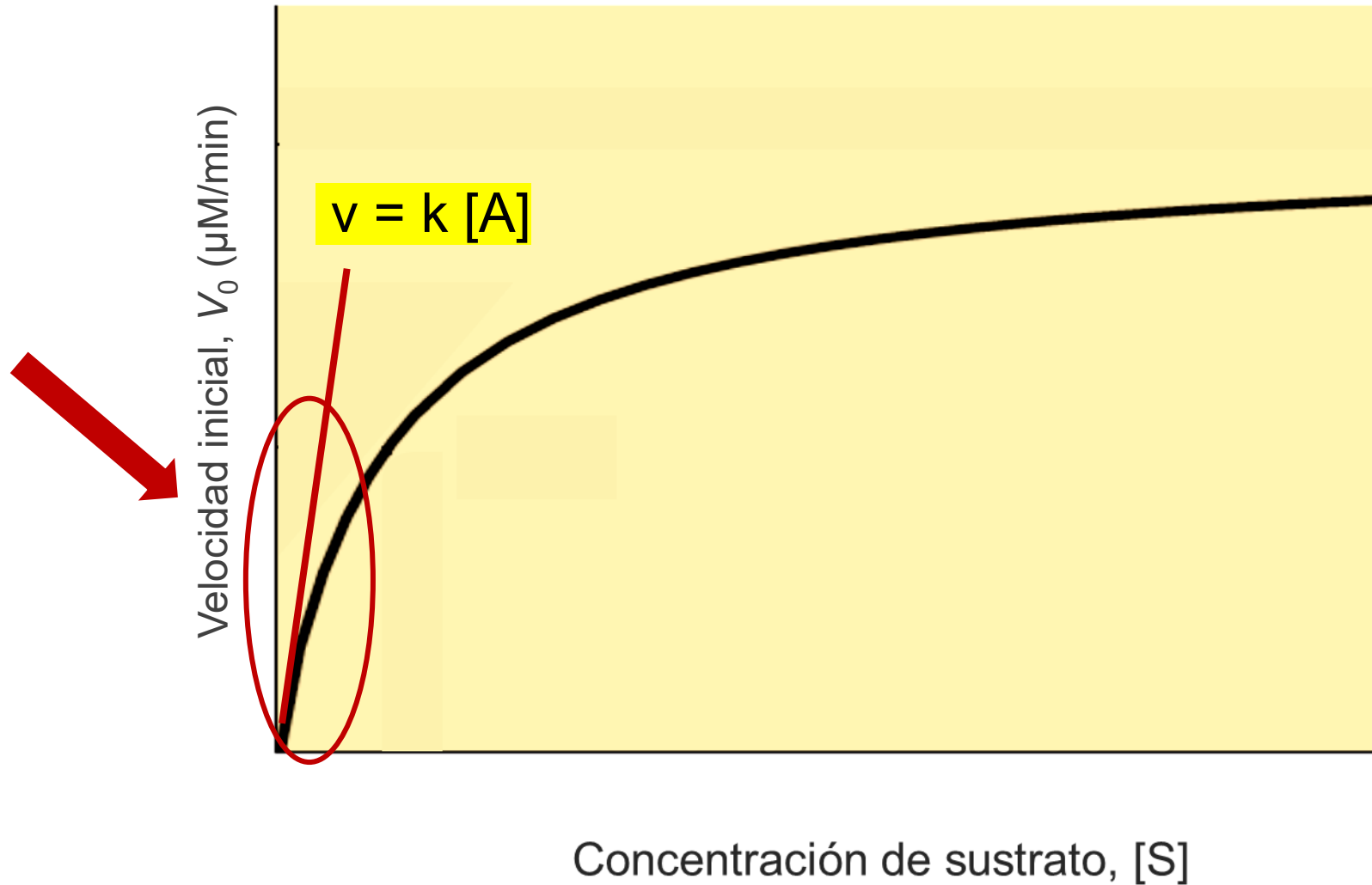


Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de la reacción

- Para estudiar la cinética enzimática se mide el **efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción**, manteniendo la cantidad de enzima constante
- **Cuando $[S]_0$ es pequeña**, la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de sustrato, y por tanto, **la reacción es de primer orden**

Comportamiento cinético de enzimas

(Henri 1903)

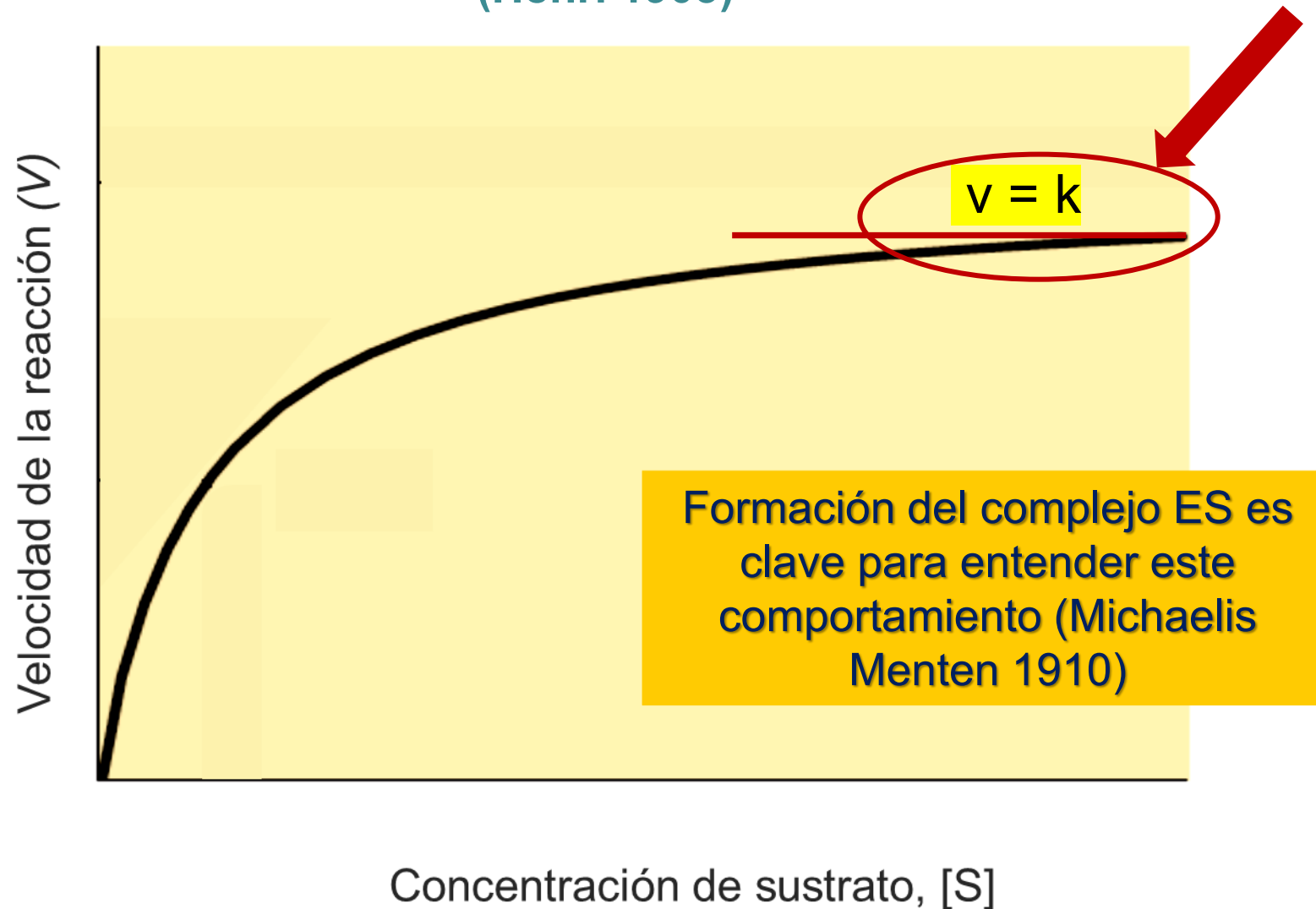


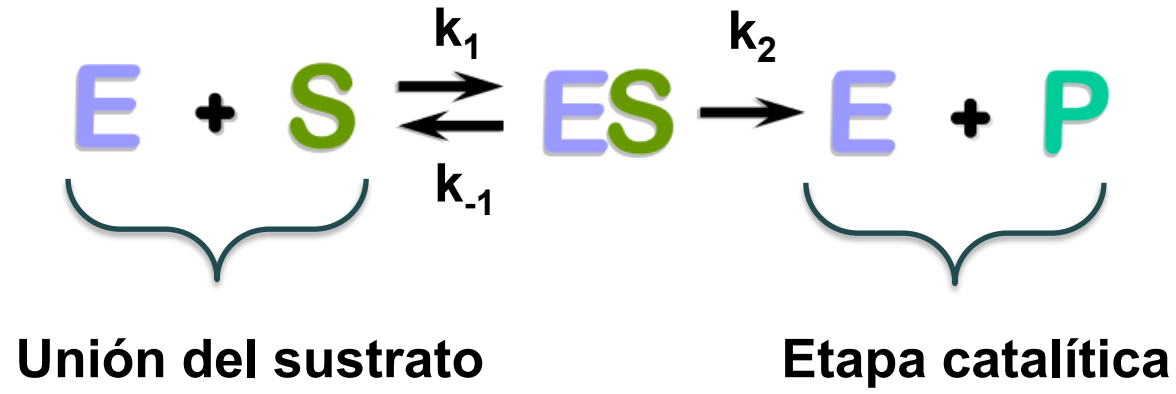
Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de la reacción

- Para estudiar la cinética enzimática se mide el **efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad inicial de la reacción**, manteniendo la cantidad de enzima constante
- Cuando $[S]_0$ es pequeña, la velocidad inicial es directamente proporcional a la concentración de sustrato, y por tanto, **la reacción es de primer orden**
- A altas $[S]_0$, el enzima se encuentra saturada por el sustrato, y la velocidad ya no depende de $[S]_0$. En este punto, **la reacción es de orden cero** y la velocidad es máxima ($V_{\max}$).

Comportamiento cinético de enzimas

(Henri 1903)





Velocidad de la catálisis:



$$v_0 = k_2 [ES]$$

Velocidad de formación y
destrucción de ES:



$$\begin{aligned}
 v_{\text{formación}} &= k_1 [E] [S] \\
 v_{\text{disociación}} &= (k_{-1} + k_2) [ES]
 \end{aligned}$$

Hipótesis del estado estacionario

(Briggs y Haldane 1925)

➤ Concentración del complejo ($[ES]$) es constante a lo largo de la reacción



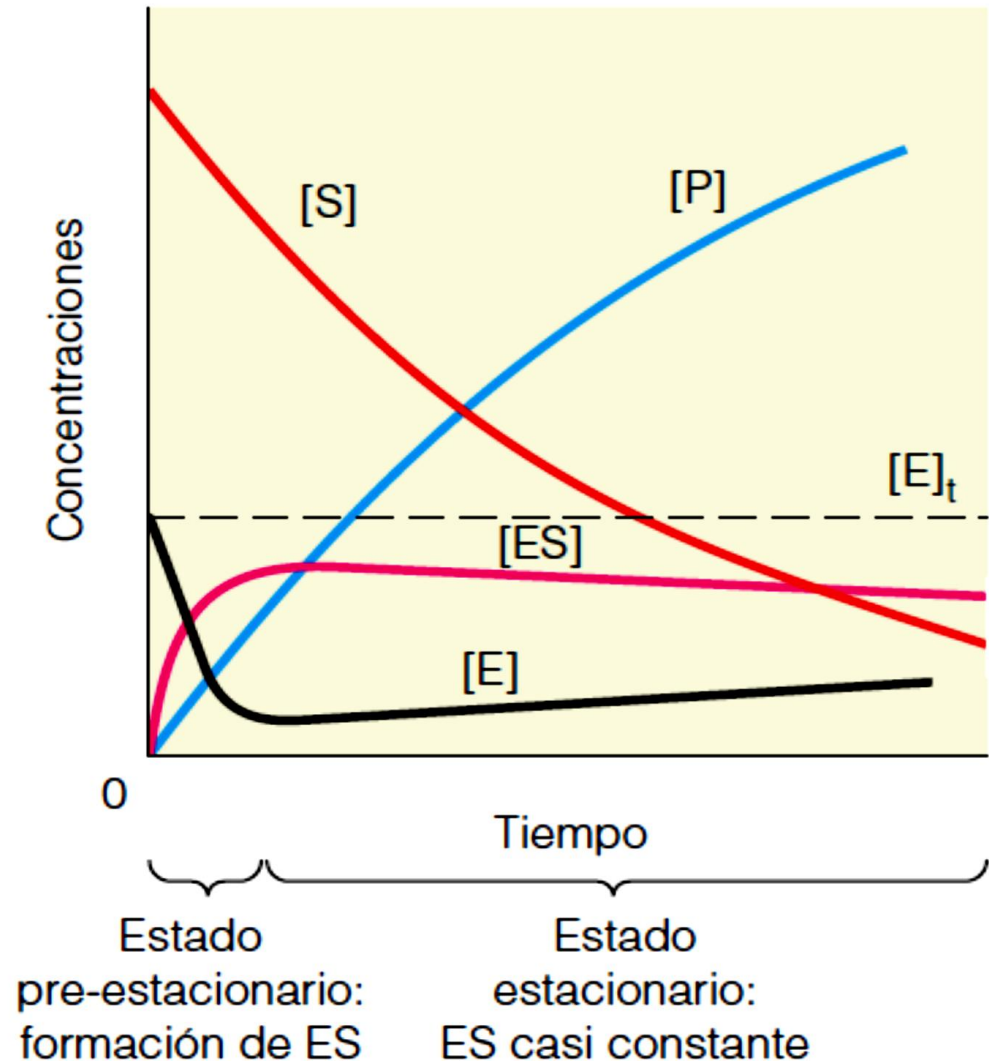
➤ Velocidad de formación del complejo ES

$$V_{\text{formación}} = k_1 [E] [S]$$

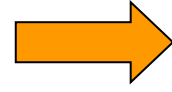
es igual a la de su disociación

$$V_{\text{disociación}} = (k_{-1} + k_2) [ES]$$

$$k_1 [E] [S] = (k_{-1} + k_2) [ES]$$



$$k_1 [E] [S] = (k_{-1} + k_2) [ES]$$



$$[E] [S] = \frac{(k_{-1} + k_2) [ES]}{k_1}$$

**Constante de
Michaelis**

$$K_m = \frac{(k_{-1} + k_2)}{(k_1)}$$



$$[E] [S] = K_m [ES]$$

➤ La concentración de **enzima libre** (E) (no unida al sustrato) puede calcularse como la diferencia entre **concentración total de enzima**, $[E_t]$, (que es constante a lo largo de la reacción) y **enzima unido al sustrato** (ES):

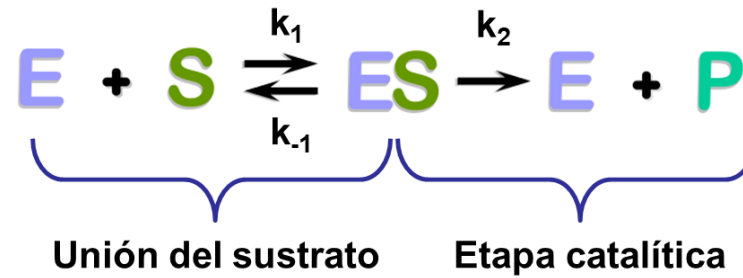
$$[E] = [E_t] - [ES]$$

$$[E] [S] = K_m [ES] \quad \longrightarrow \quad ([E_t] - [ES])[S] = K_m [ES]$$

Rordenando términos



$$\frac{[E_t] [S]}{K_m + [S]} = [ES]$$



$$v_0 = k_2 [\text{ES}]$$

Tenemos que

$$[\text{ES}] = \frac{[\text{E}_t] [\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}$$

Multiplico ambos términos por

k_2

$$k_2 [\text{ES}] = \frac{k_2 [\text{E}_t] [\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}$$



$$v_0 = \frac{k_2 [\text{E}_t] [\text{S}]}{K_m + [\text{S}]}$$

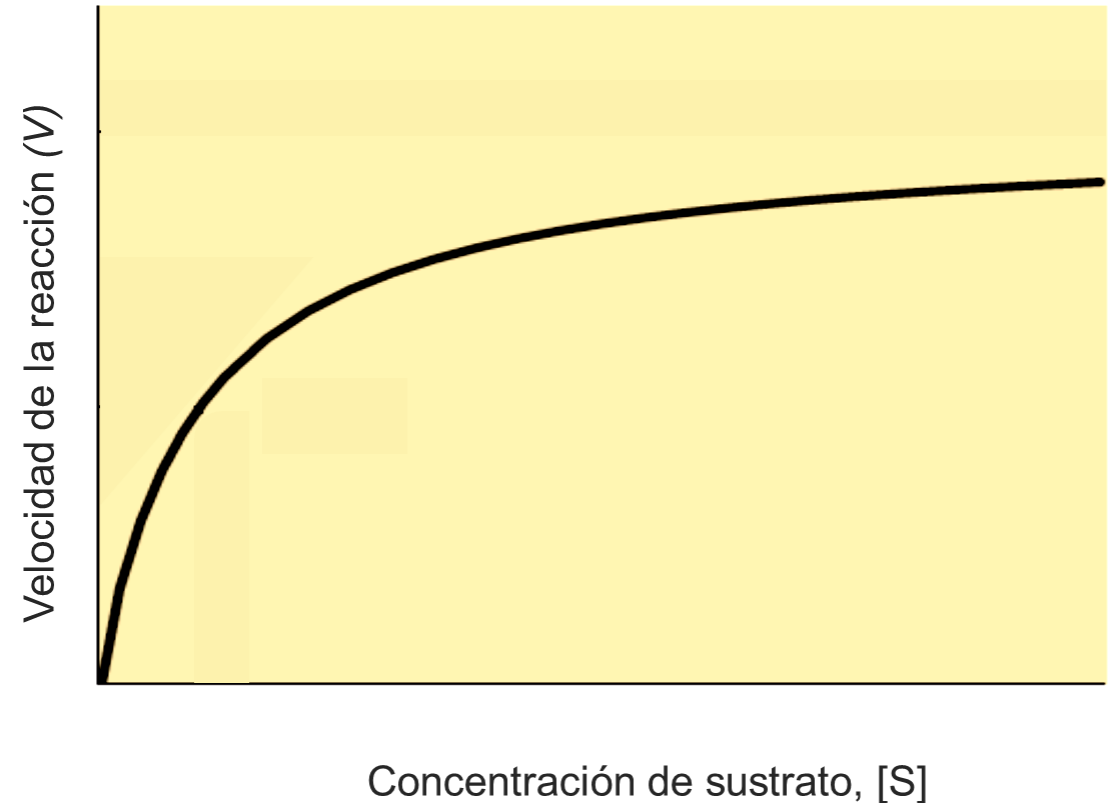
Para cualquier reacción enzimática
 $[\text{E}_t]$ es fija y la k_2 y K_m son constantes

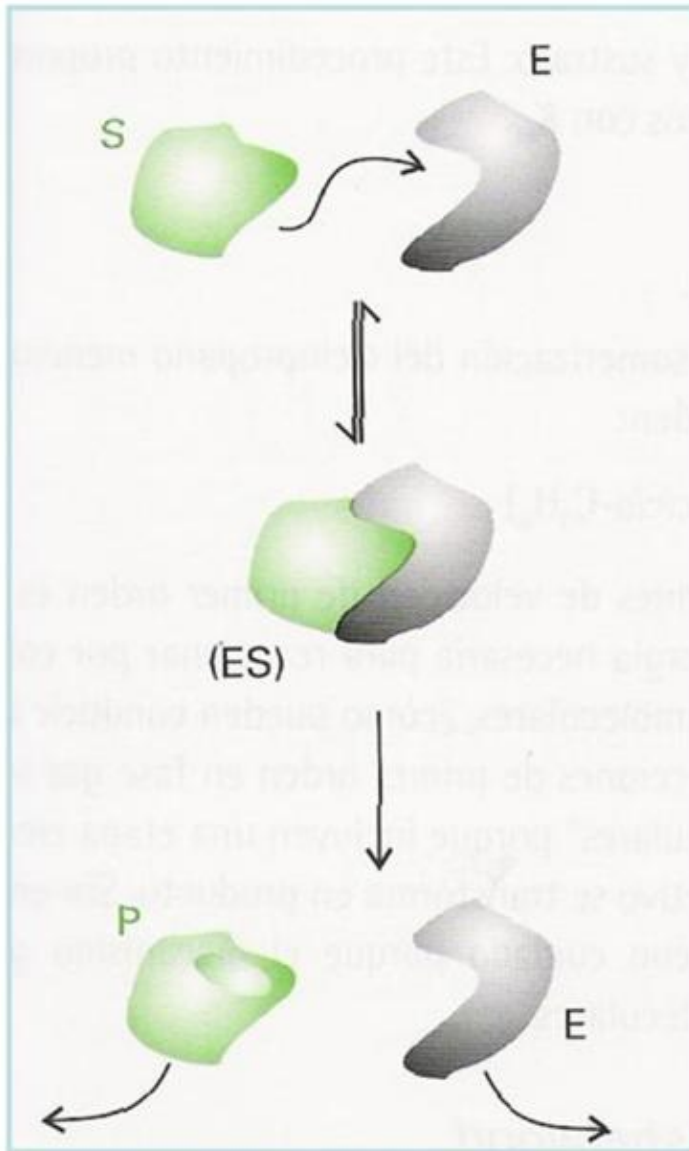
- Cuando toda la enzima está formando el complejo [ES] (es decir $[ES] = [E_t]$) podemos definir la velocidad como:

$$V_{\max} = k_2 [E_t]$$

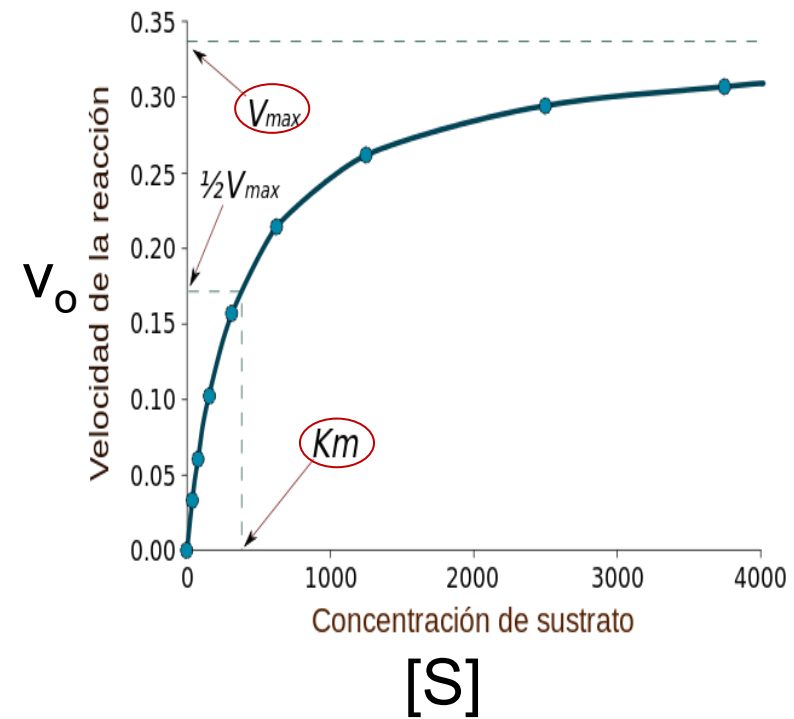
Ecuación de Michaelis-Menten

$$v_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$





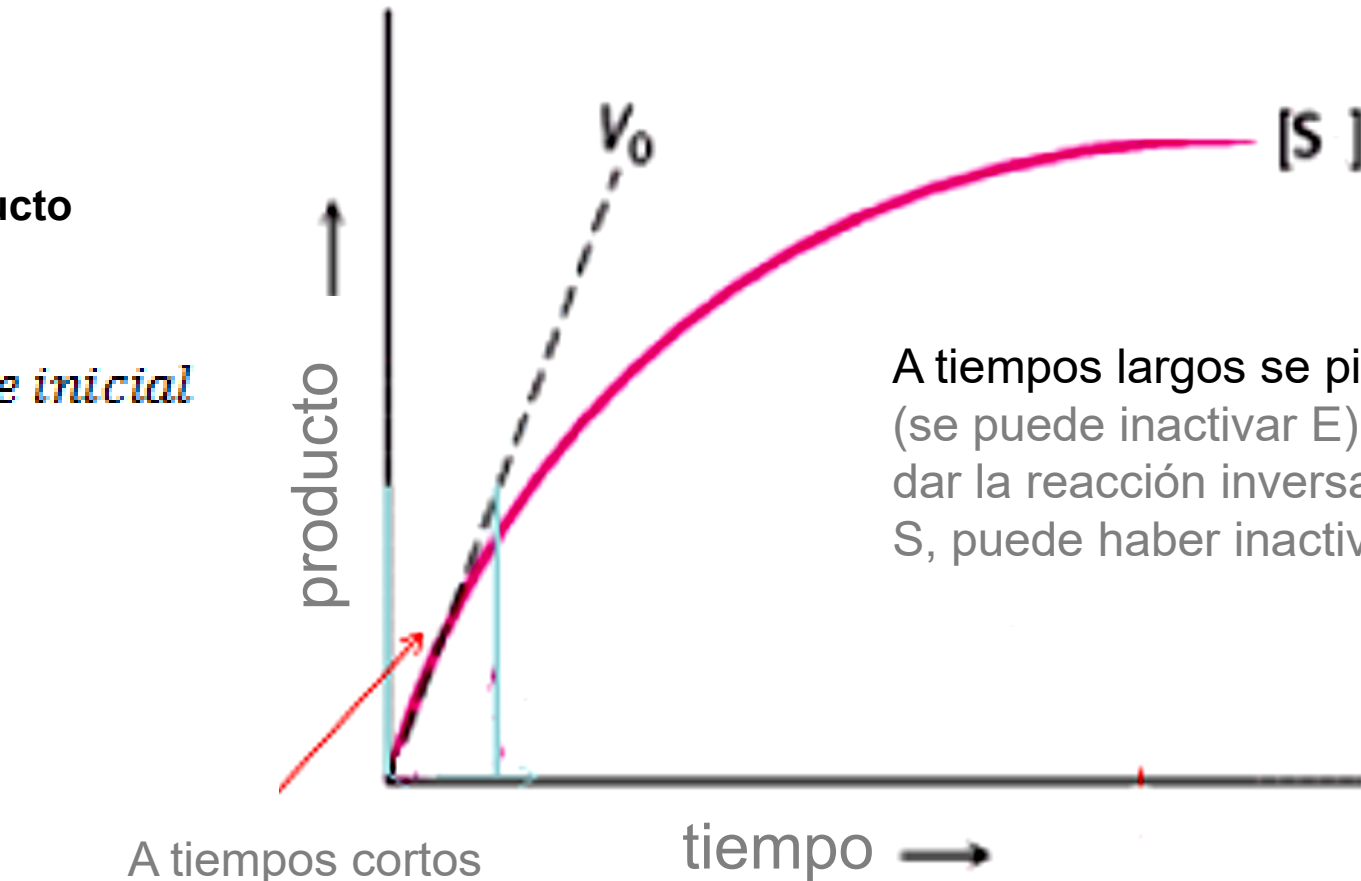
Como se valida experimentalmente el modelo de Michaelis Menten?



¿Qué representa v_o y cómo podemos determinarla experimentalmente?

Velocidad inicial
de formación de producto

$$v_o = \frac{d[P]}{dt} = \text{pendiente inicial}$$

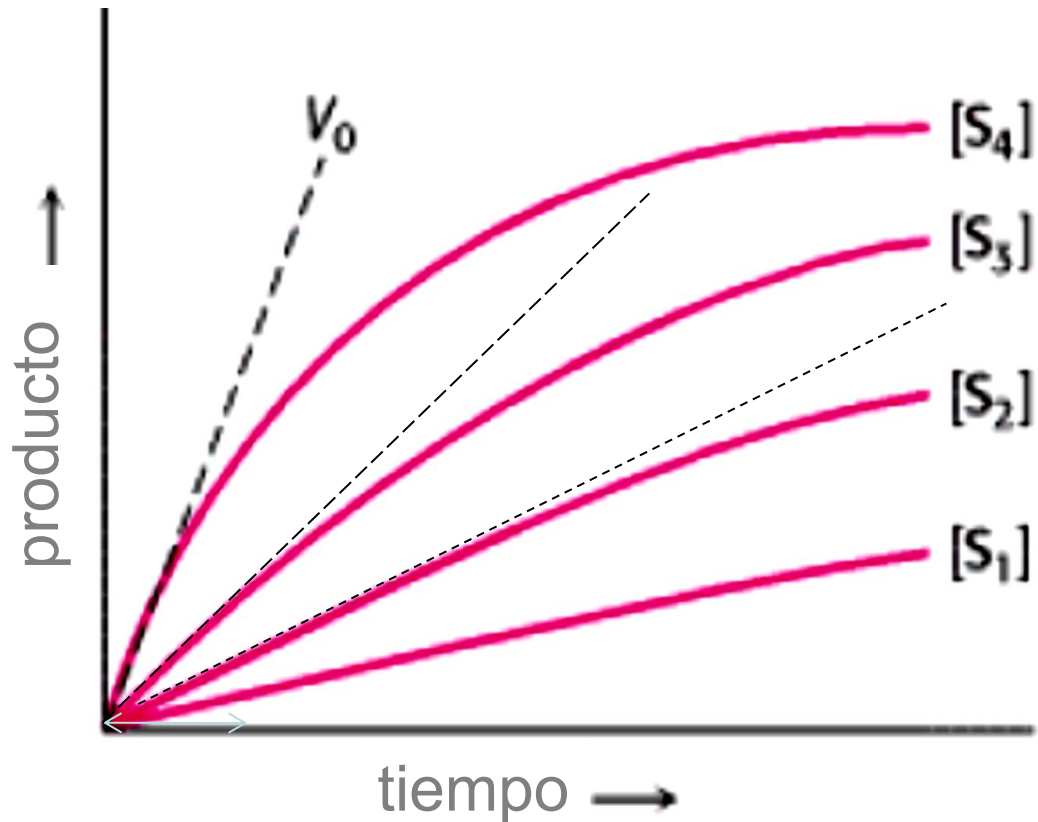


A tiempos largos se pierde la linealidad
(se puede inactivar E), se puede comenzar a
dar la reacción inversa, se consume todo el
S, puede haber inactivación de la E por P)

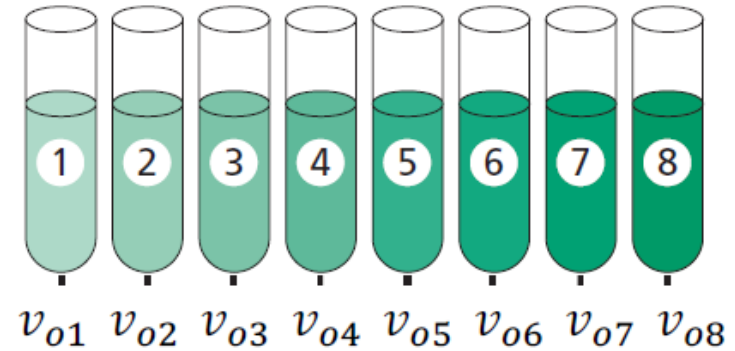
A tiempos cortos
la relación de [P] vs tiempo
es lineal (primer orden)

$[E]_o$ = concentración de enzima
en la reacción o ensayo (fija)

Realizo el mismo ensayo cinético variando la $[S]$ determinando V_0 para cada $[S]$



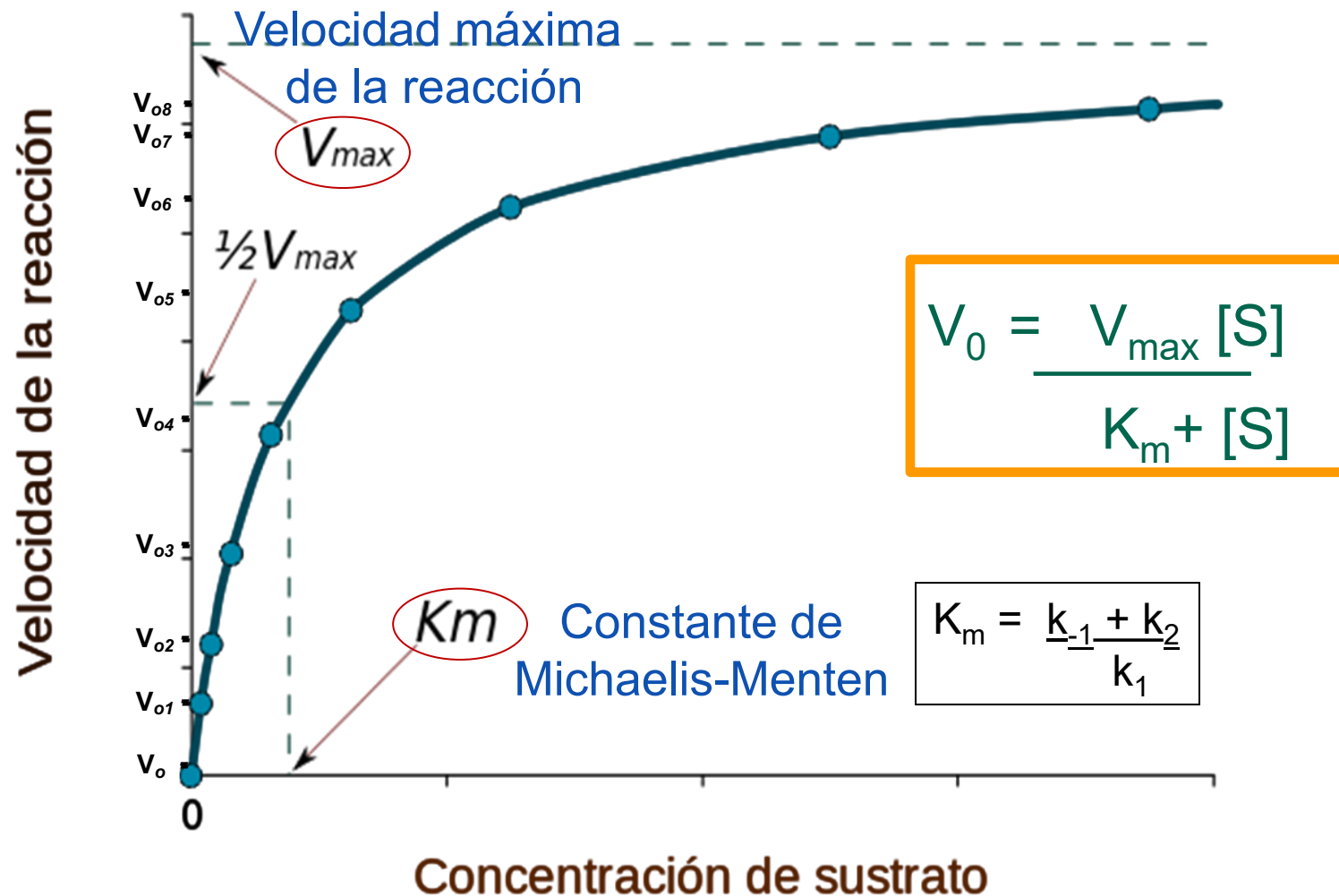
$[E]$ rango $\mu M - nM$
 $[S]$ rango $mM - \mu M$



- El ensayo se realiza en condiciones definidas de pH, fuerza iónica y temperatura
- $[E]_0$ = concentración de enzima en la reacción fija
- Se grafica luego con cada valor de v_0 en función de la $[S]$

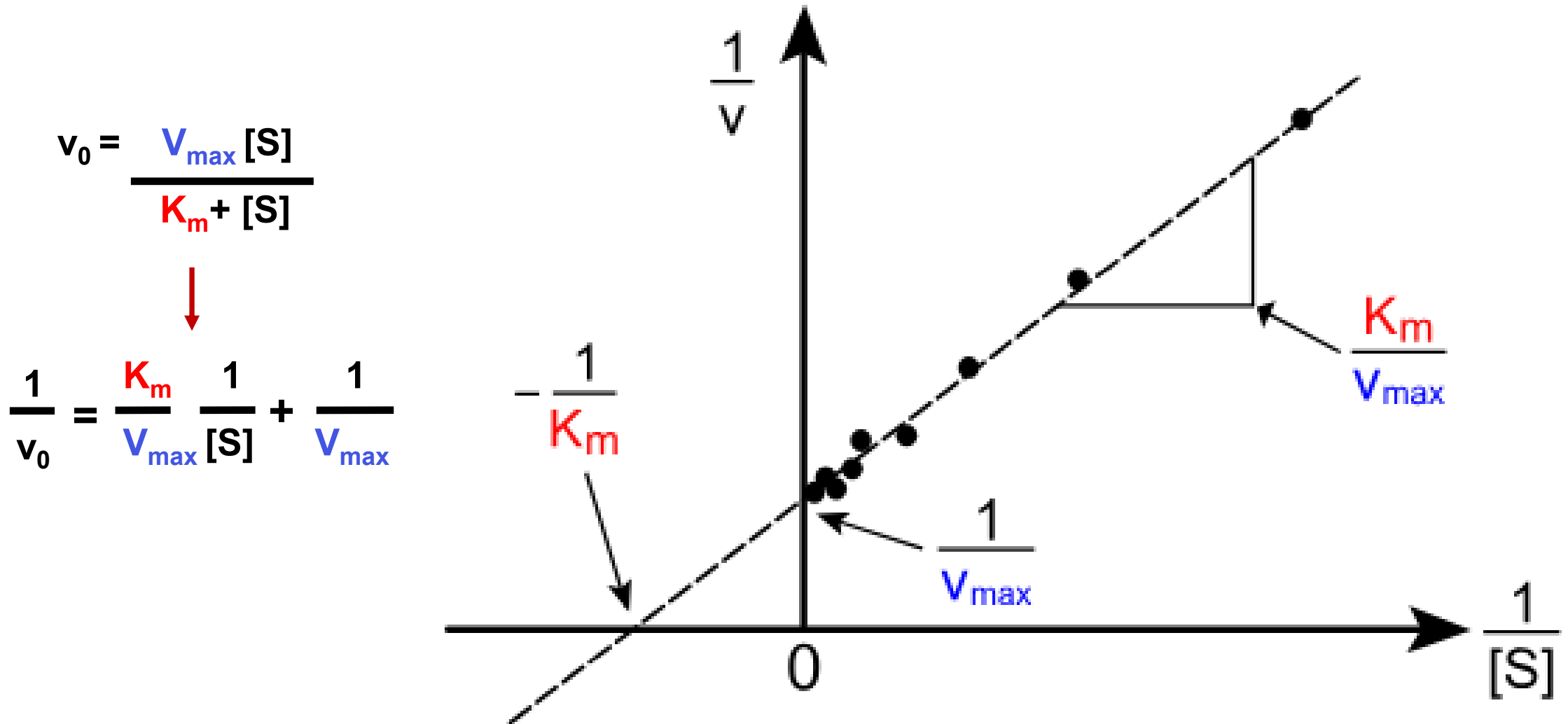


- Graficamos los valores de velocidad para cada concentración de sustrato
- **Curva de saturación de una reacción enzimática** muestra la relación entre la (v_o) y la $[S]$
- Define una hipérbola rectangular ($y = ax/b+x$)



Linealización de la ecuación de M-M

- Gráfico de dobles recíprocos o de Lineweaver-Burk



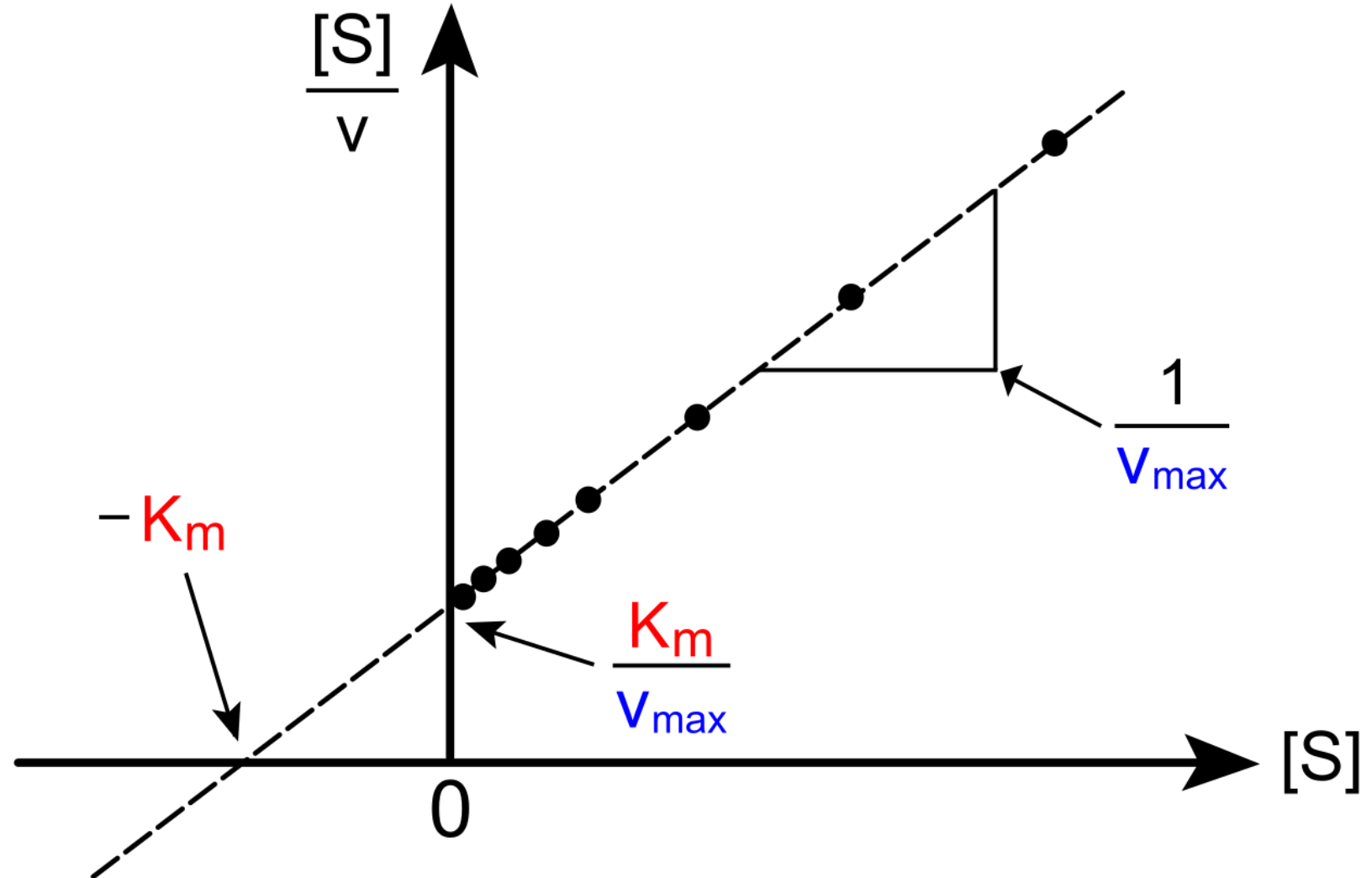
Linearización de la ecuación de M-M

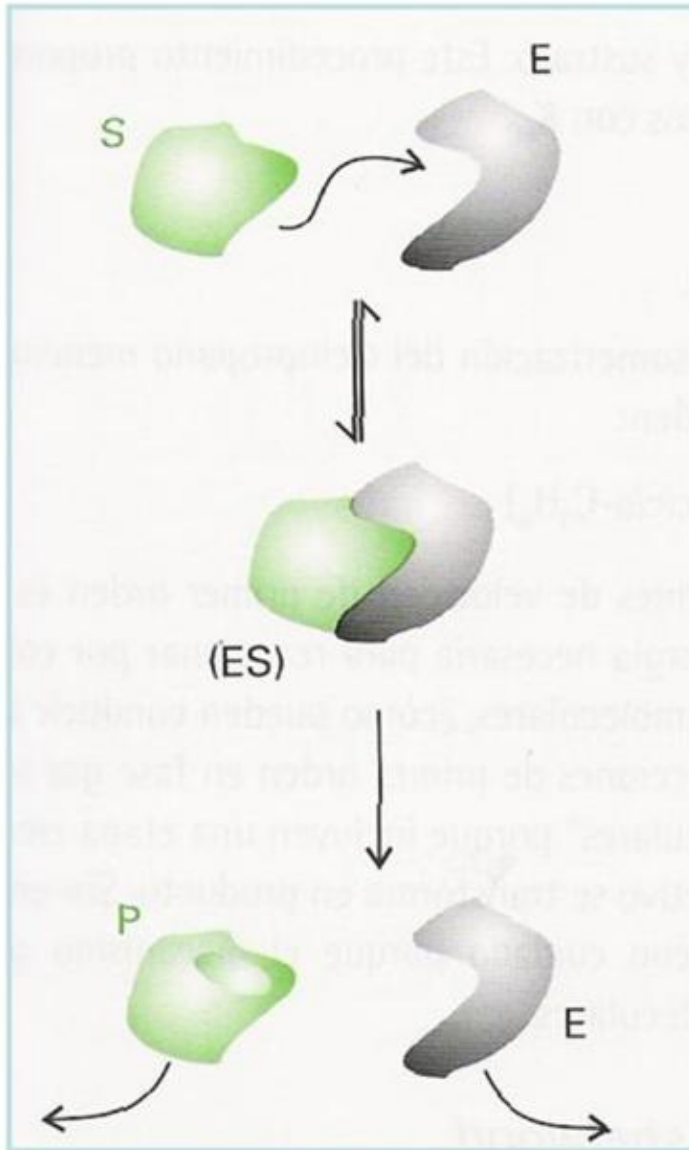
➤ Grafico de Hanes-Wolff

$$\frac{1}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

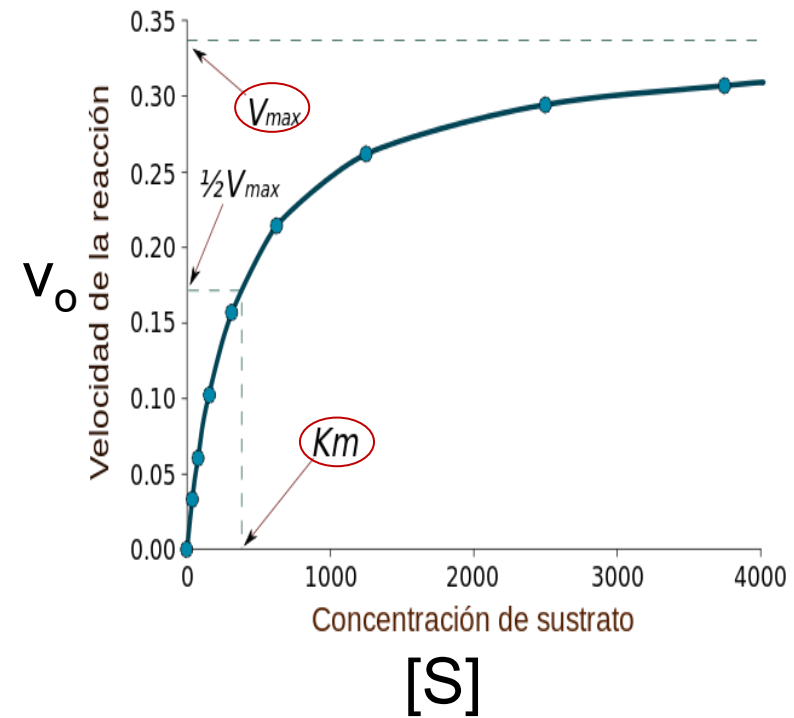


$$\frac{[S]}{v_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \left(\frac{1}{V_{\max}} \right) [S]$$

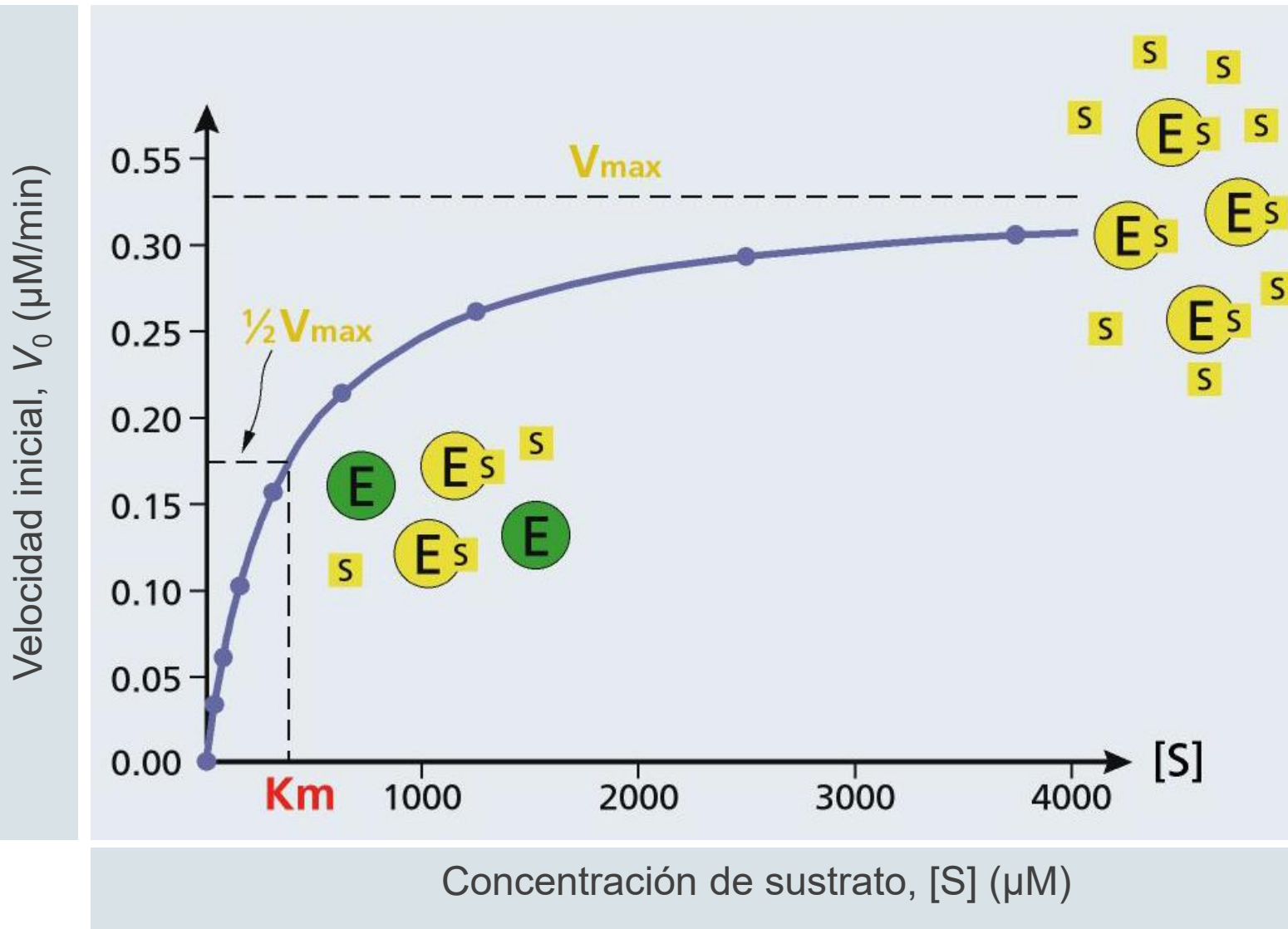




Que información
obtenemos de la
ecuación de Michaelis
Menten?



K_m o constante de Michaelis-Menten

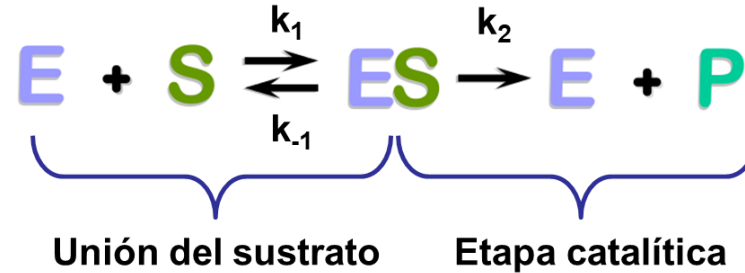


- K_m representa la cantidad de sustrato necesaria para fijarse a la mitad de la E disponible y producir la mitad de la V_{max} .
- Es $[S]$ a la cual $v_o = \frac{1}{2} V_{\text{max}}$

La K_m como cociente de constantes de velocidad de la reacción

Sólo si $k_2 \ll k_{-1}$

$$K_m = \frac{k_{-1} + \cancel{k_2}}{k_1} \rightarrow K_m = \frac{k_{-1}}{k_1}$$



- En estas condiciones se corresponde con la **constante de disociación del complejo ES** :

$$K_{ES} = \frac{[E][S]}{[ES]} = \frac{k_{-1}}{k_1} = K_s$$

En esta situación la K_m da idea de la afinidad de la E por el S

- K_M **alto** = asociación débil entre ES (es decir k_1 pequeña) = **baja afinidad de E por el S**
- K_M **bajo** = asociación fuerte entre ES (es decir k_1 grande) = **alta afinidad de E por el S**

K_m o constante de Michaelis-Menten

- Nos permitirá conocer la concentración celular de [S] aproximada
- Conocer cuál es la [S] necesaria para una catálisis significativa
- Generalmente decimos que a 10 (K_m) considero estoy en condiciones de V_{max}
- Los valores de K_m y V_{max} nos permiten conocer la fracción de sitios activos (f_{ES}) que están ocupados para una enzima y [S] determinada

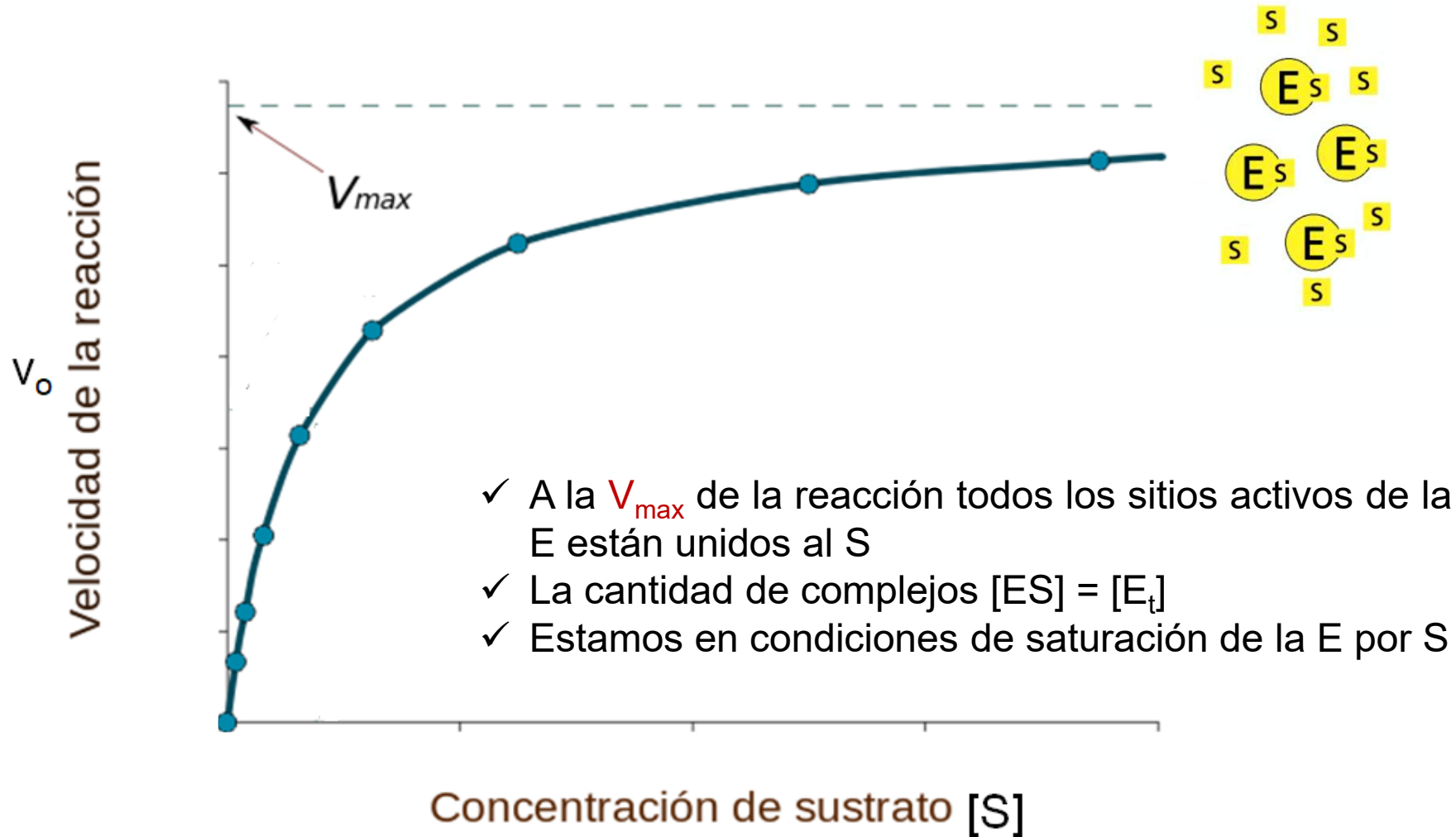
$$f_{ES} = \frac{v_o}{V_{MAX}} = \frac{[S]}{K_M + [S]}$$

Cada enzima tiene un valor de K_m característico para un determinado S el cual puede dar una idea de su 'afinidad ' por este

TABLE 8.5 K_M values of some enzymes

Enzyme	Substrate	$K_M(\mu M)$
Chymotrypsin	Acetyl-L-tryptophanamide	5000
Lysozyme	Hexa-N-acetylglucosamine	6
β -Galactosidase	Lactose	4000
Threonine deaminase	Threonine	5000
Carbonic anhydrase	CO ₂	8000
Penicillinase	Benzylpenicillin	50
Pyruvate carboxylase	Pyruvate	400
	HCO ₃ ⁻	1000
	ATP	60
Arginine-tRNA synthetase	Arginine	3
	tRNA	0.4
	ATP	300

Velocidad máxima de la reacción o V_{max}



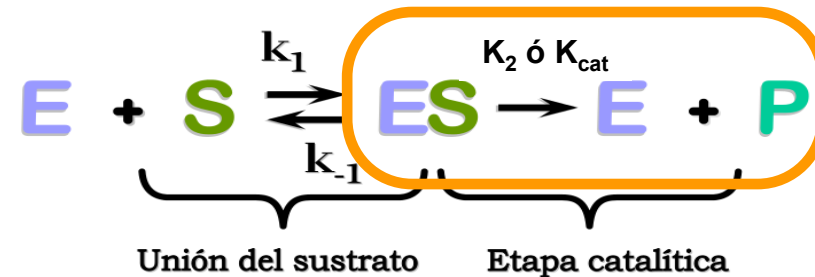
Para determinar la V_{max} de una reacción enzimática, la $[S]$ se incrementa hasta que se obtiene una tasa constante de formación de producto.

Constante catalítica, k_{cat}

- Cuando estamos en condiciones de V_{max} , constante de velocidad (k_2) es denominada k_{cat} (constante catalítica) ó número de recambio

$$V_{max} = k_{cat} [E_t]$$

$$k_{cat} = V_{max} / [E_t]$$



- k_{cat} es una constante de velocidad de primer orden.
- Representa el **número de moléculas de S procesadas por segundo por cada sitio activo de E**, en condiciones de saturación.
- Tiene unidades de tiempo⁻¹ (**segundos⁻¹**)
- Útil para reacciones donde entran en juego varias constantes de velocidad ya que esta constante de velocidad **describe el paso limitante** en condiciones de saturación.

k_{cat} (constante catalítica)

número de moléculas de S procesadas por la molécula de E cada segundo

COMPARACION DE k_{cat} DE DIFERENTES ENZIMAS

Enzyme	Turnover number (per second)
Carbonic anhydrase	600,000
3-Ketosteroid isomerase	280,000
Acetylcholinesterase	25,000
Penicillinase	2,000
Lactate dehydrogenase	1,000
Chymotrypsin	100
DNA polymerase I	15
Tryptophan synthetase	2
Lysozyme	0.5

La constante de especificidad o eficiencia catalítica

La eficiencia de una enzima puede ser expresada en términos de k_{cat}/K_m

• cuando $[S] \ll K_m$

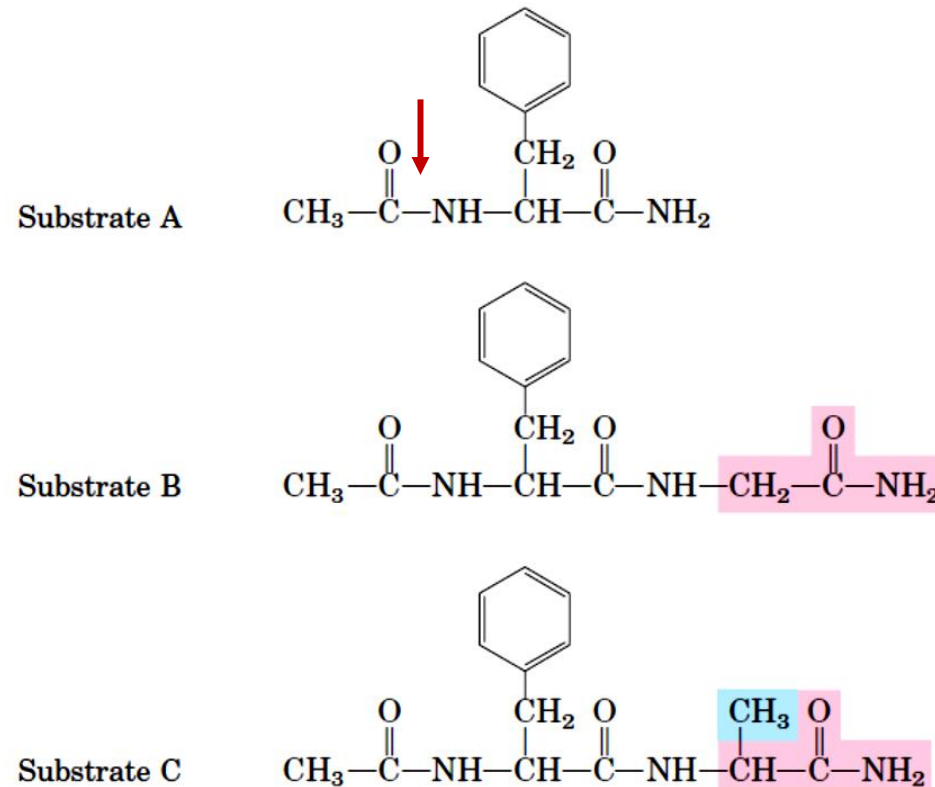
$$v_0 = \frac{k_{\text{cat}} [E_t] [S]}{K_m + [S]} \rightarrow \frac{k_{\text{cat}}}{K_m} = \frac{v_0}{[E_t] [S]}$$

- Para la velocidad de la reacción entre E y S, dependerá de k_{cat}/K_m , $[E_t]$ y $[S]$.
- Es una ecuación de segundo orden (unidades de $M^{-1} s^{-1}$)
- Tiene en cuenta la velocidad de la catálisis (k_{cat}) y la naturaleza de la enzima y sustrato (K_M)
- Es una constante útil para comparar **la eficiencia catalítica** de diferentes enzimas para un mismo sustrato, o una enzima respecto a dos sustratos diferentes
- El límite superior de k_{cat}/K_M es la constante de difusión en medio acuoso ($10^9 M^{-1} s^{-1}$)

Enzyme	$k_{\text{cat}}/K_M (s^{-1}M^{-1})$
Acetylcholinesterase	1.6×10^8
Carbonic anhydrase	8.3×10^7
Catalase	4×10^7
Crotonase	2.8×10^8
Fumarase	1.6×10^8
Triose phosphate isomerase	2.4×10^8
β -Lactamase	1×10^8
Superoxide dismutase	7×10^9

Los estudios cinéticos proporcionan información acerca:

- DE LA ESPECIFICIDAD DE LA ENZIMA (que sustratos prefiere)
- Ej: Quimiotripsina



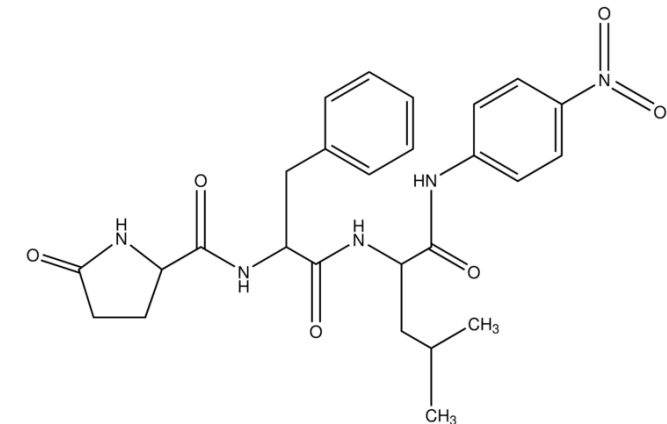
k_{cat} (s^{-1})	K_{m} (mM)	$k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
0.06	31	2
0.14	15	10
2.8	25	114

Los estudios cinéticos proporcionan información acerca:

- DE LA ESPECIFICIDAD DE LA ENZIMA (que sustratos prefiere)
- COMPARACIÓN ENTRE ENZIMAS QUE ACTÚAN SOBRE UN MISMO SUSTRATO

Cinética utilizando el sustrato PFLNA

Enzima	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (s ⁻¹ M ⁻¹)
AntA	0.203	0.095	470
AntB	0.126	0.011	87
AntC	0.140	0.126	900
Bromelaina	0.098	0,029	305

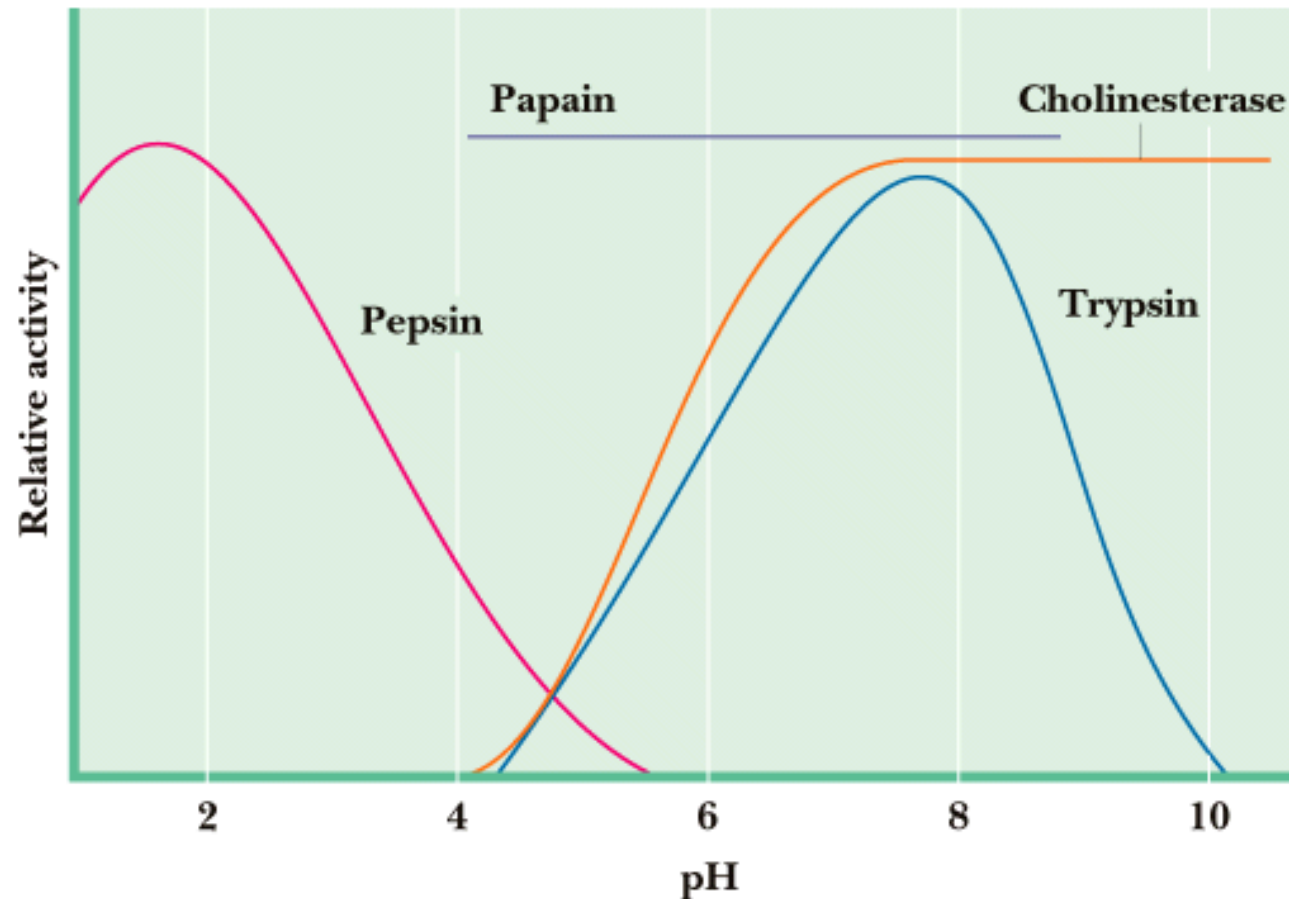


PFLNA:
pGlu-Phe-Leu p-nitroanilide
Sustrato cromogénico

Los estudios cinéticos proporcionan información acerca:

- DE LA ESPECIFICIDAD DE LA ENZIMA (que sustratos prefiere)
- COMPARACIÓN ENTRE ENZIMAS QUE ACTÚAN SOBRE UN MISMO SUSTRATO
- DEL MECANISMO DE REACCION (pueden necesitar estudios adicionales)
- DE CÓMO CAMBIA LA VELOCIDAD DE REACCIÓN (V_o) EN RESPUESTA A LA MODIFICACIÓN DE DIFERENTES FACTORES:
 - ✓ concentración de enzima
 - ✓ concentración de ligandos (sustratos, activadores e inhibidores)
 - ✓ condiciones ambientales (pH, temperatura, fuerza iónica)

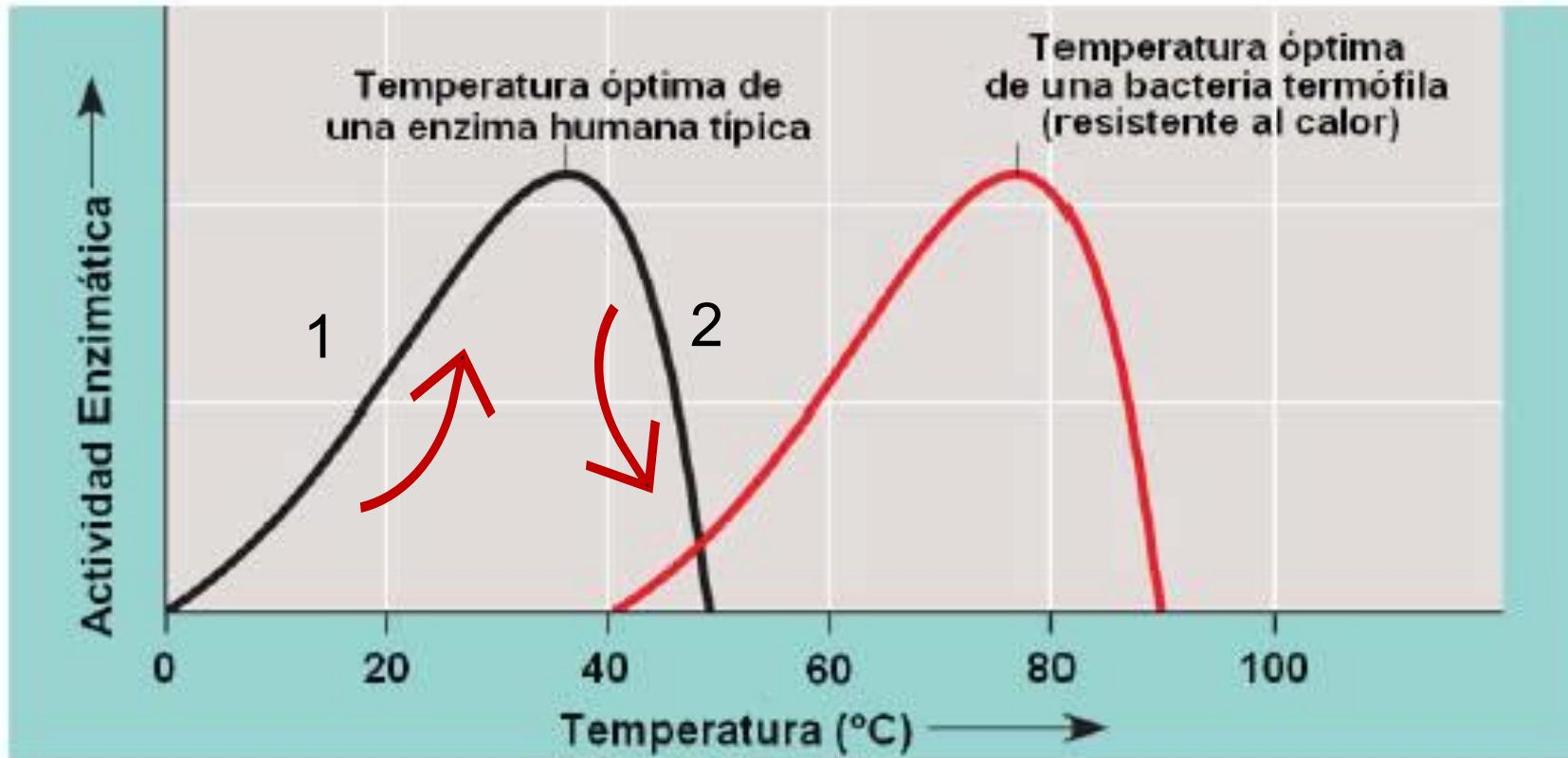
pH óptimo de actividad de una enzima



Optimum pH of Some Enzymes

Enzyme	Optimum pH
Pepsin	1.5
Catalase	7.6
Trypsin	7.7
Fumarase	7.8
Ribonuclease	7.8
Arginase	9.7

Temperatura óptima de actividad de una enzima

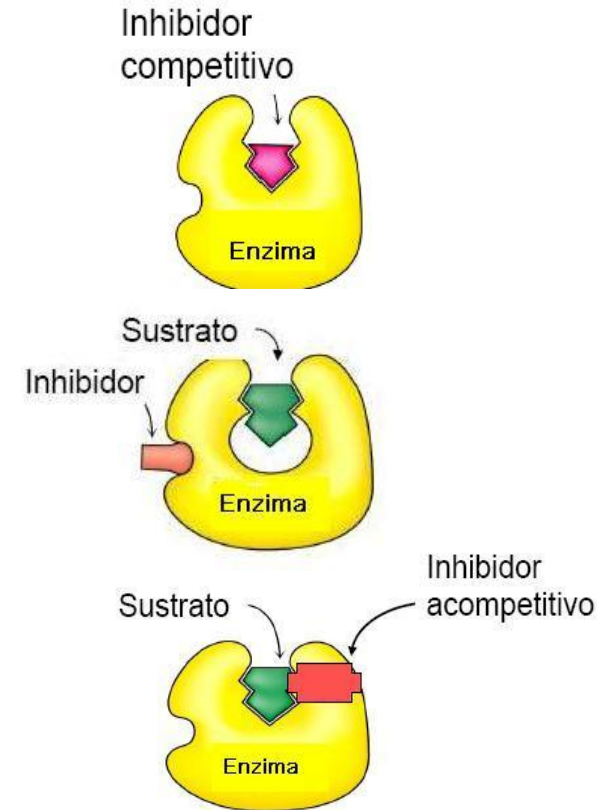


1. Aumento de la energía cinética de las moléculas
2. Desnaturalización térmica

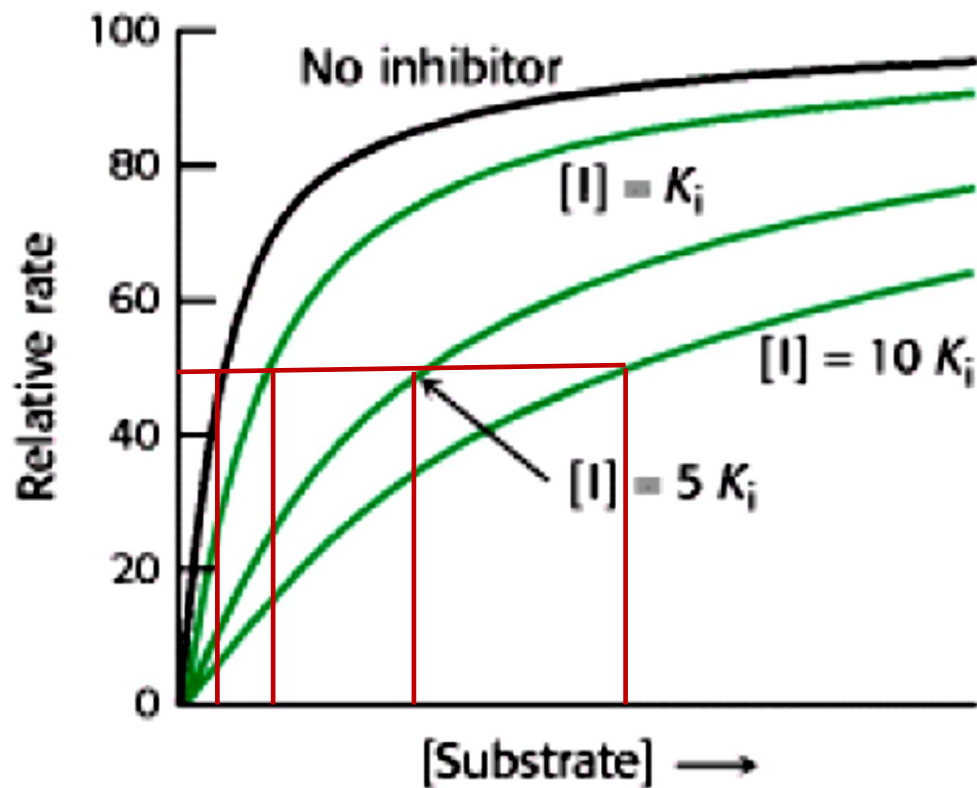
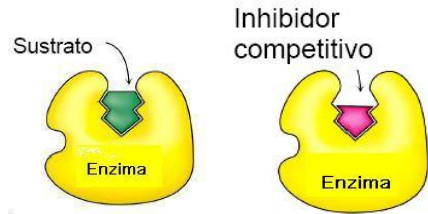
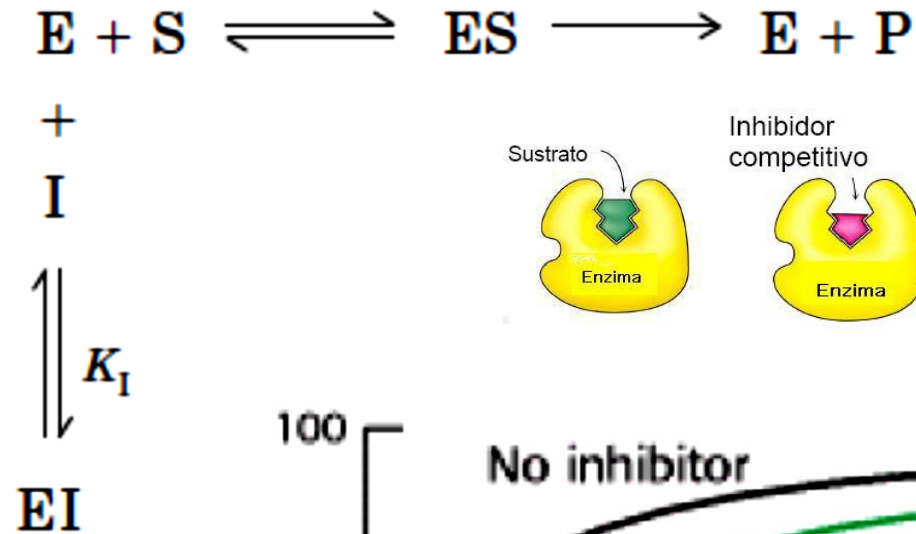
Inhibición de la acción enzimática

- Son sustancias que reducen la actividad de una enzima
- Dos tipos de inhibición:
 - ✓ Reversible
 - ✓ Irreversible
- Puede suministrar conocimiento acerca del mecanismo de acción enzimática y/o identificar residuos importantes en la catálisis
- Suelen ser blanco de estudio como biofármacos

Inhibición reversible



Inhibición reversible: Competitiva



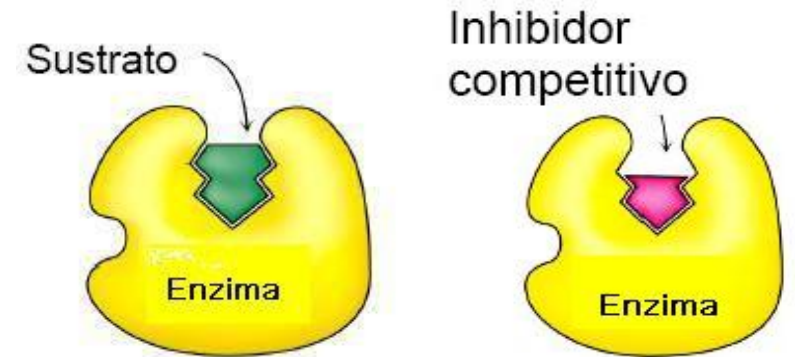
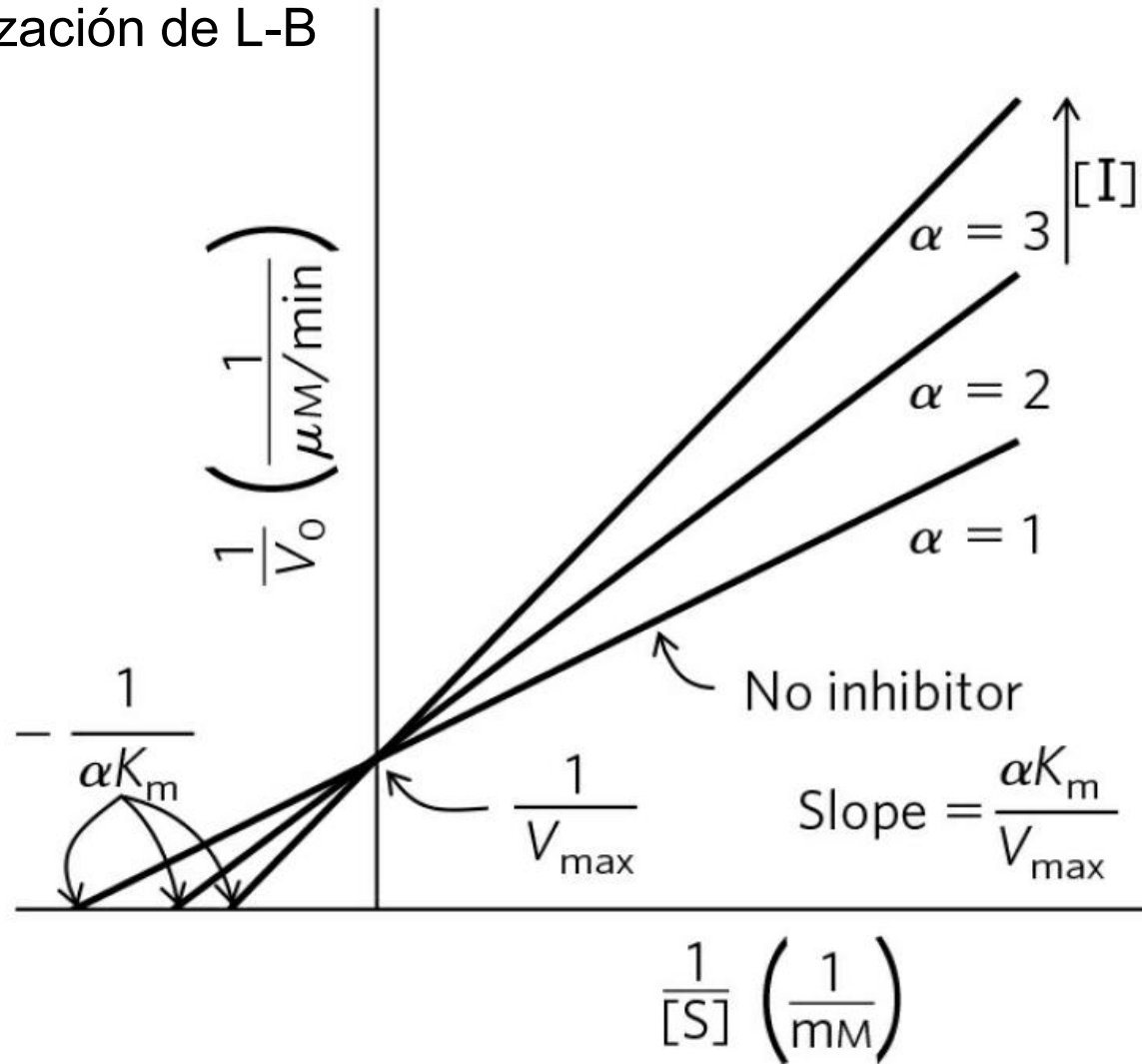
- Cuanto mayor sea la $[I]$, mas tengo que aumentar la $[S]$ para desplazar el equilibrio a la formación de $[ES]$
- Si aumento la $[S]$ puedo revertir la inhibición y llegar a $= V_{max}$
- Este efecto afectará a la K_m (aumenta) en un factor α .
- Este valor (αK_m) se conoce como K_m^{app}

$$V_0 = \frac{V_{max} [S]}{\alpha K_m + [S]}$$

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \quad K_i = \frac{[E][I]}{[EI]}$$

Inhibición reversible: Competitiva

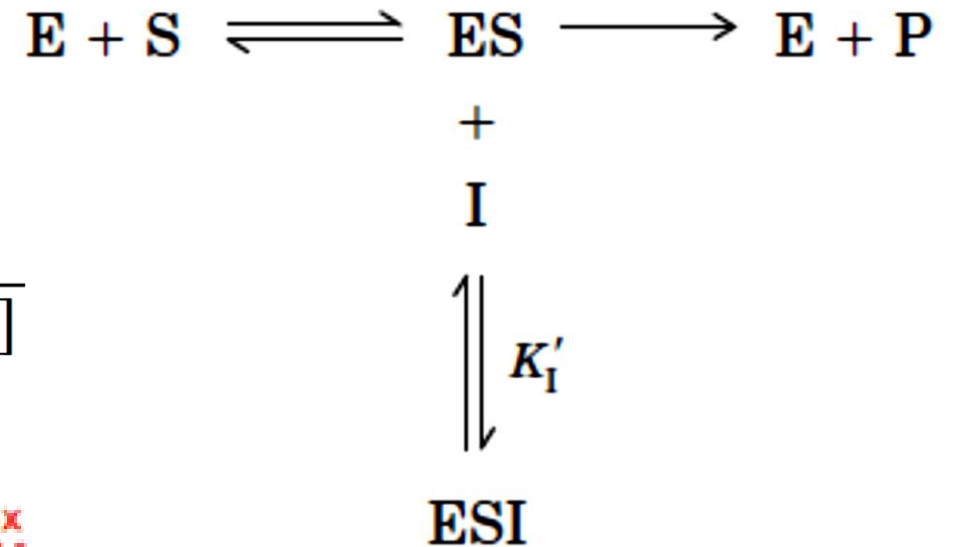
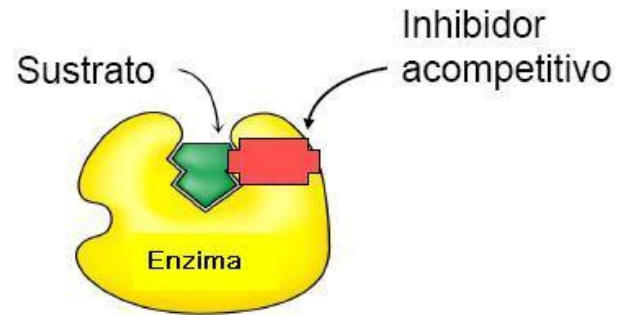
Linealización de L-B



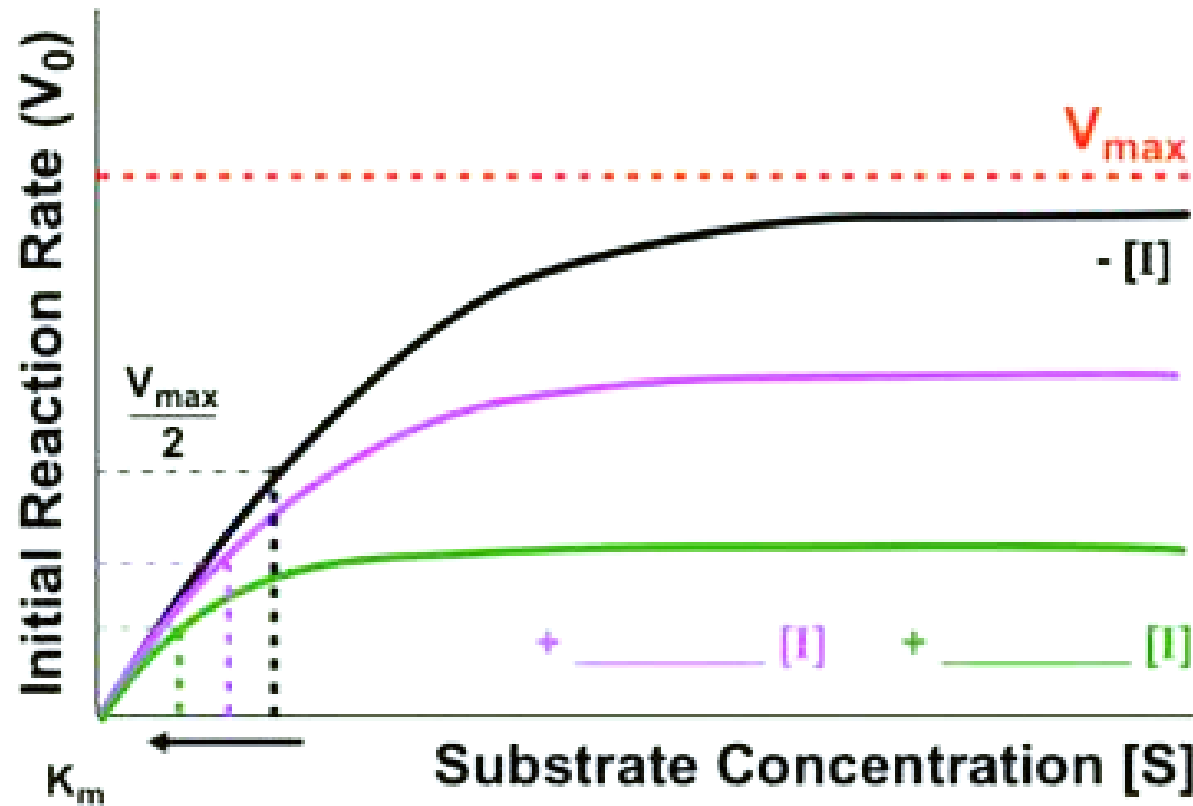
$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

Aumenta K_M^{app}

Inhibición reversible: Acompetitiva



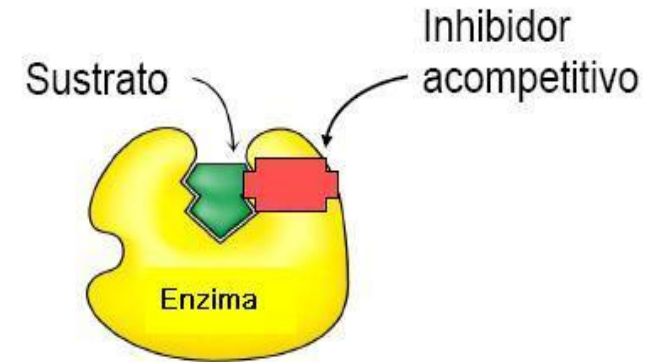
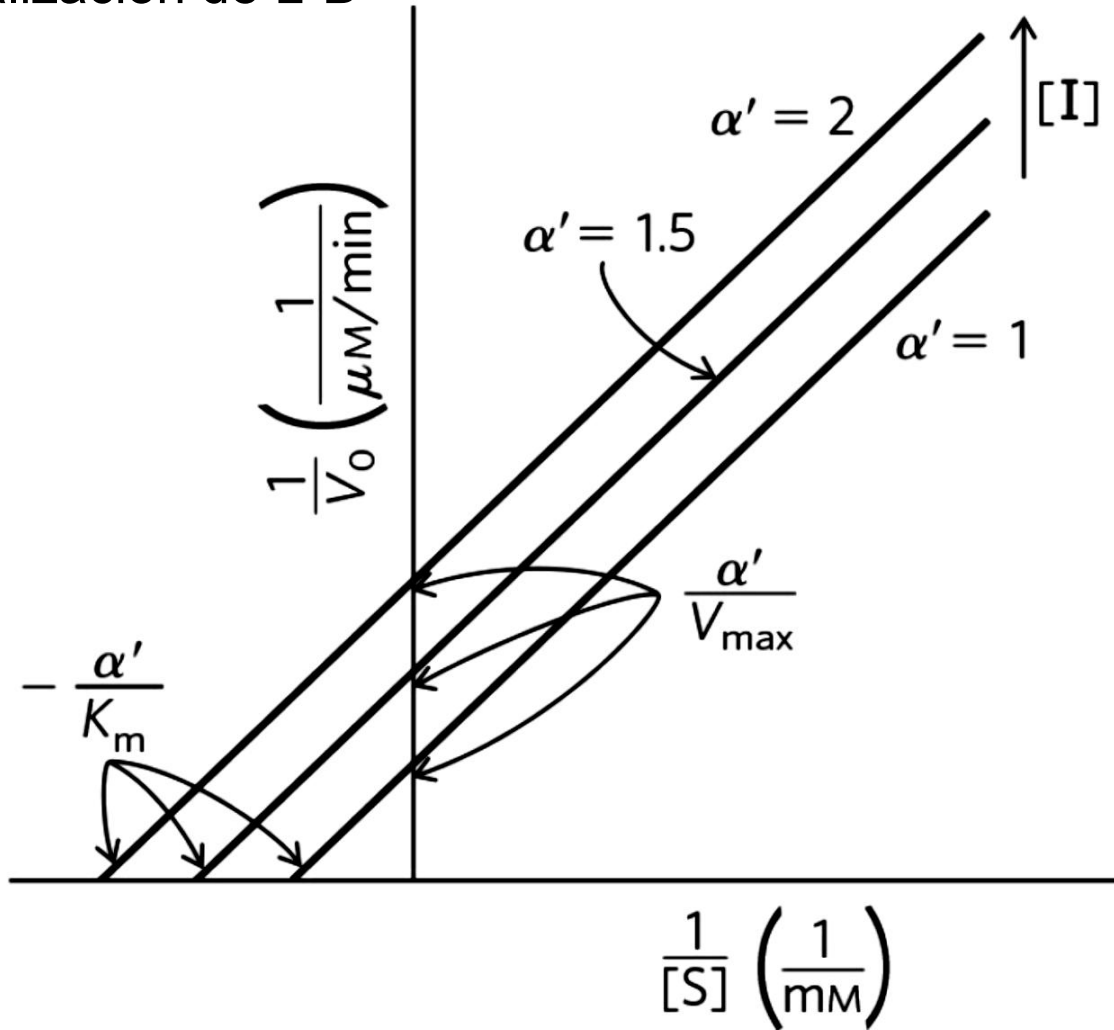
$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + \alpha' [S]}$$



- Disminuye el valor aparente de $V_{\max}$
- Disminuye la K_m aparente

Inhibición reversible: Acompetitiva

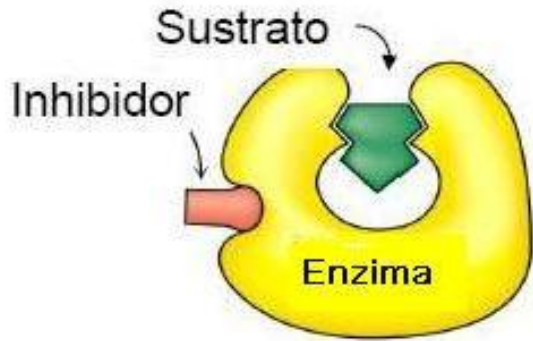
Linealización de L-B



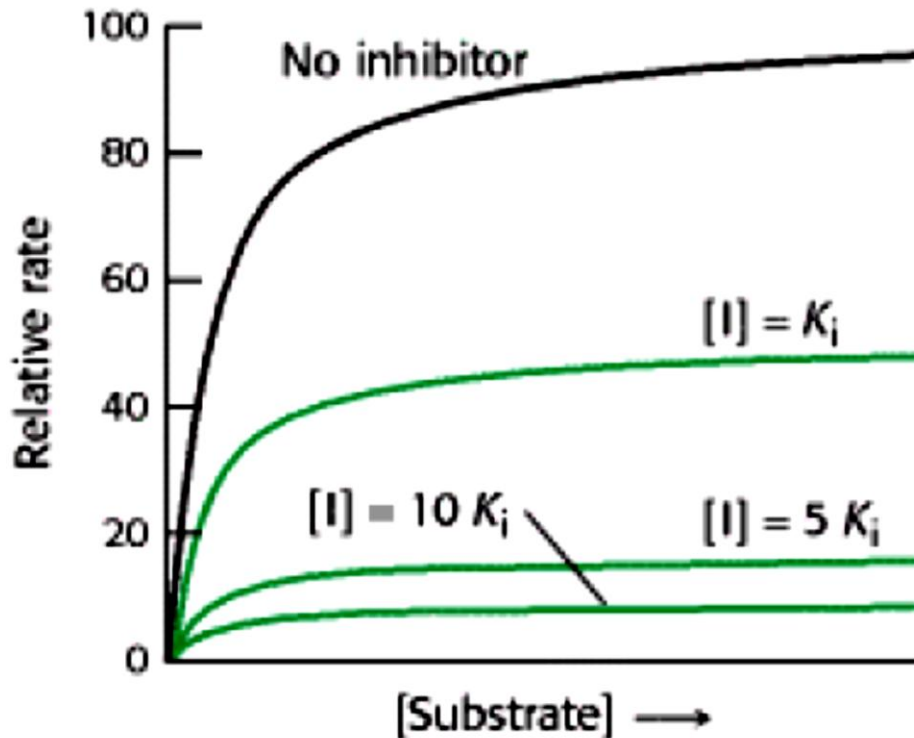
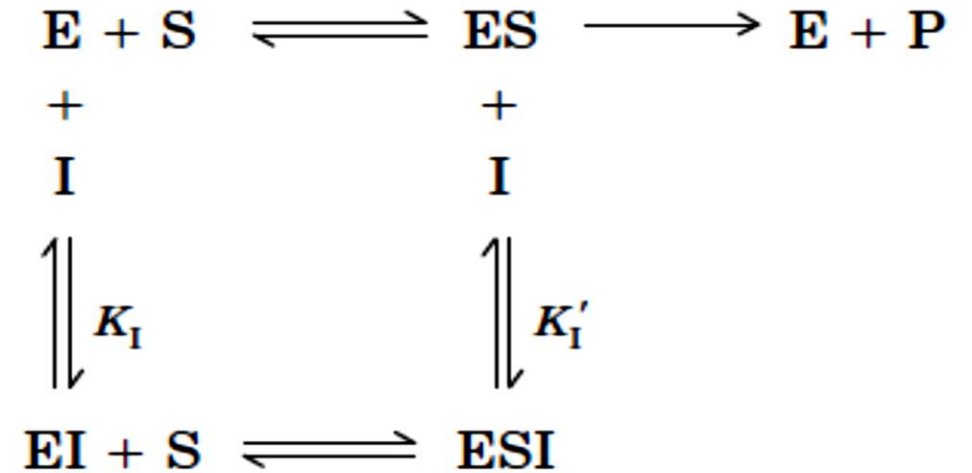
$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{K_m}{V_{\max}} \right) [S] + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$$

Disminuye K_M^{app} y $V_{\max}^{\text{ap}}$

Inhibición reversible: No competitiva (mixta)



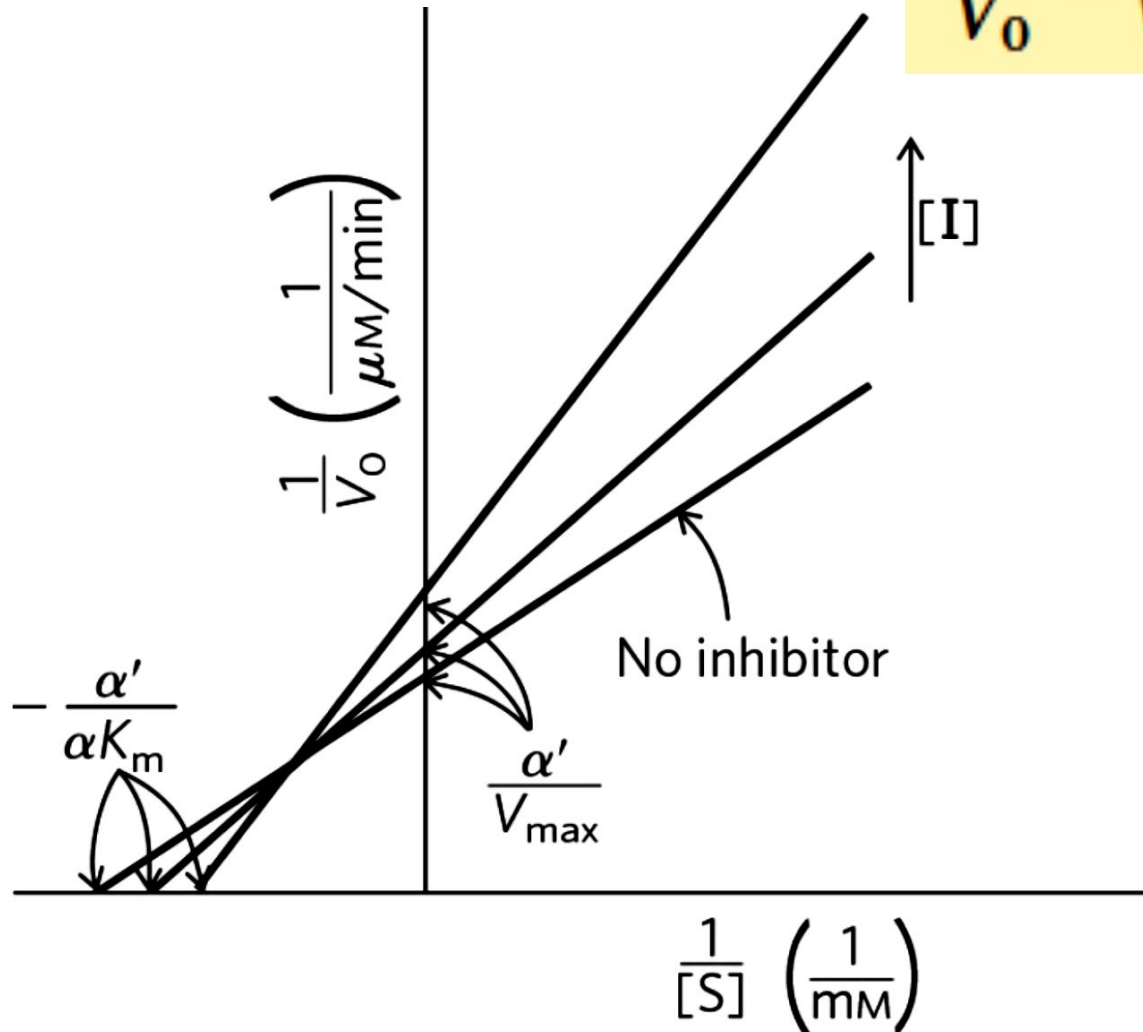
$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{\alpha K_m + \alpha' [S]}$$



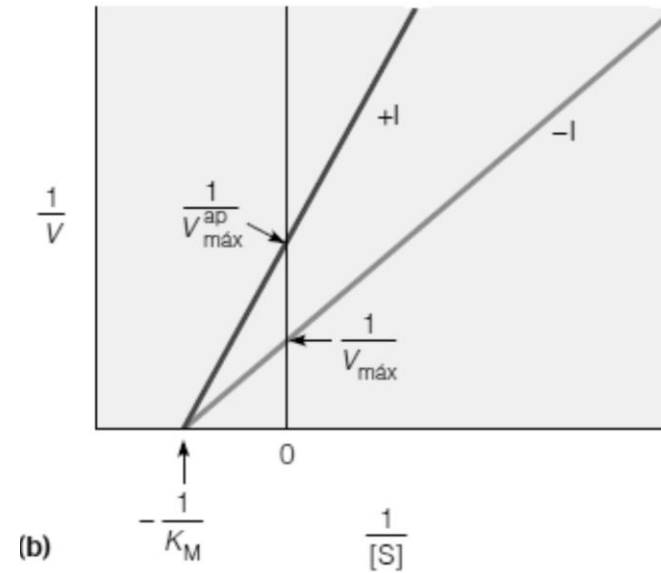
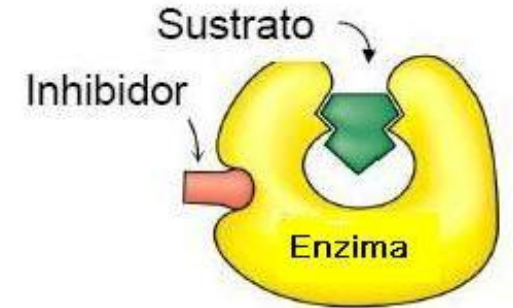
- El inhibidor puede unirse a la enzima libre y también al complejo ES.
- Aunque aumente la $[S]$ no se logra llegar a valores de $V_{\max}$,
- El K_m puede aumentar.
- Disminuye la $V_{\max}$ aparente

Inhibición reversible: No competitiva (mixta)

Linealización de L-B



$$\frac{1}{V_0} = \left(\frac{\alpha K_m}{V_{\max}} \right) \frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{\max}}$$

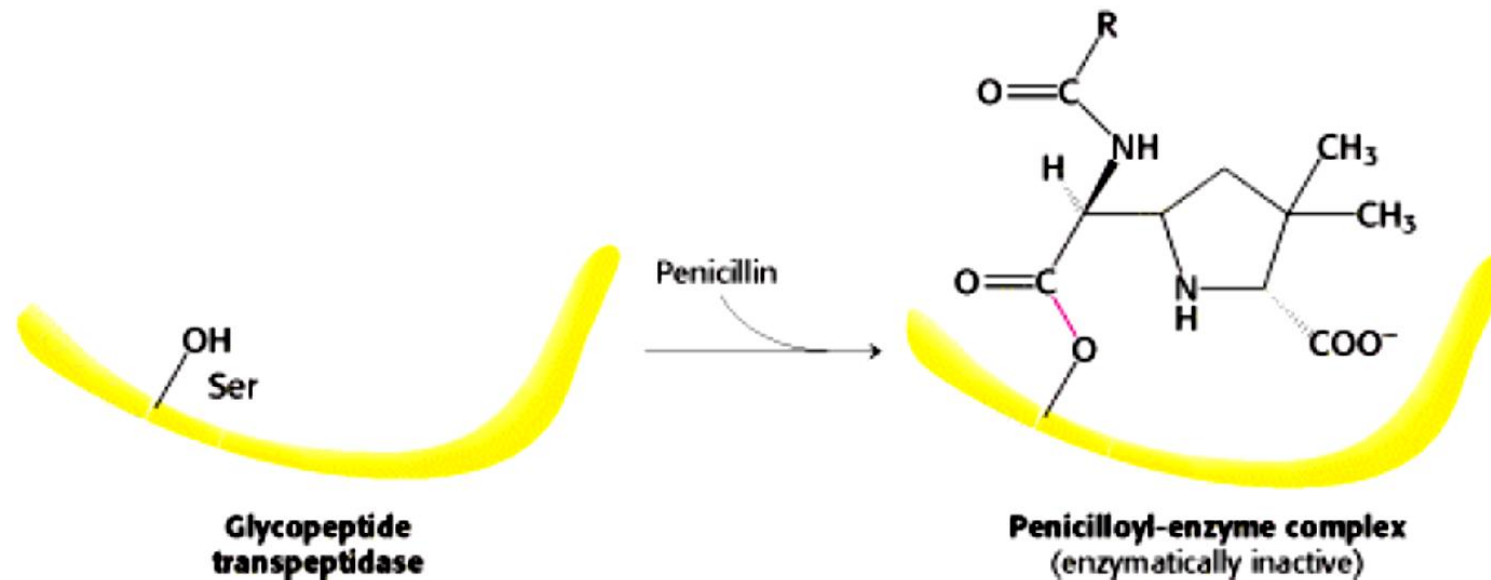


Disminuye $V_{\max}^{app}$; puede aumentar K_M^{app}

Inhibición irreversible

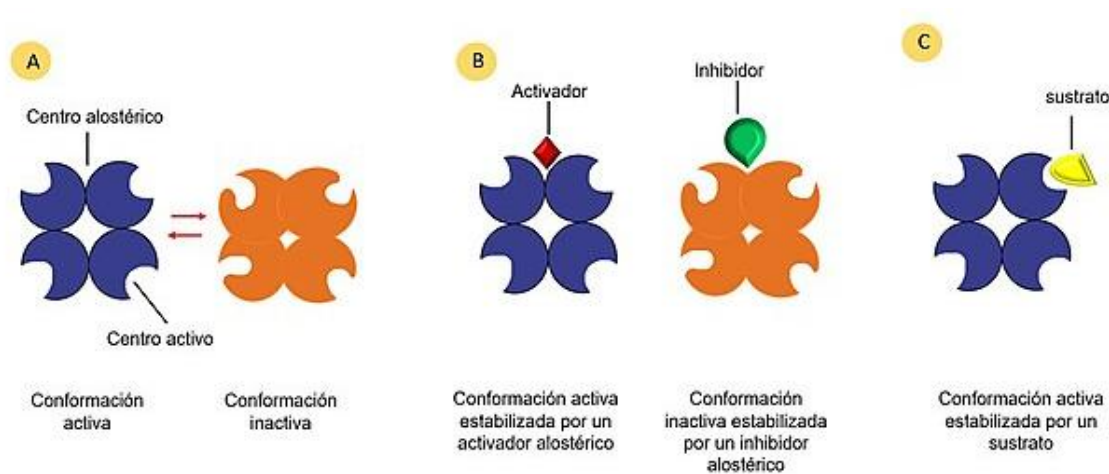
- El complejo enzima-inhibidor es de disociación lenta o nula
- Se produce la inactivación de la enzima y se impiden posteriores uniones (inhibidores suicidas).

Ejemplo La penicilina, inhibe una transpeptidasa implicada en la síntesis de péptidogilcano, componente fundamental de la pared celular bacteriana.

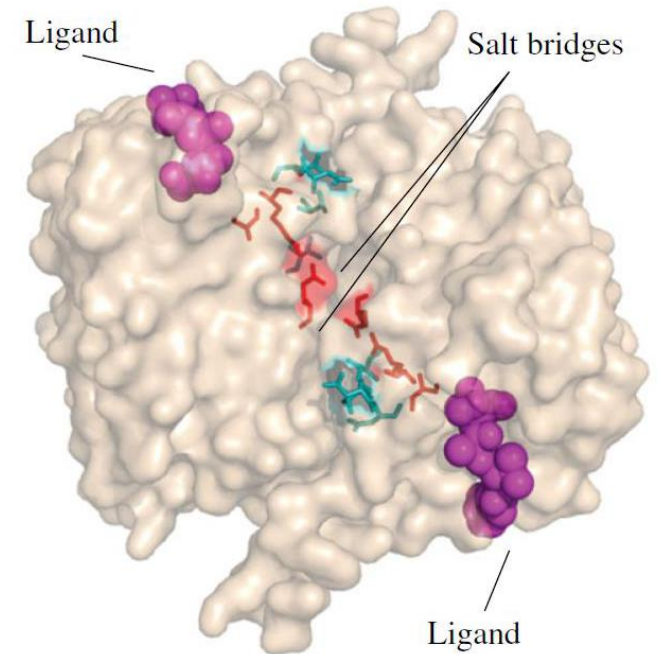
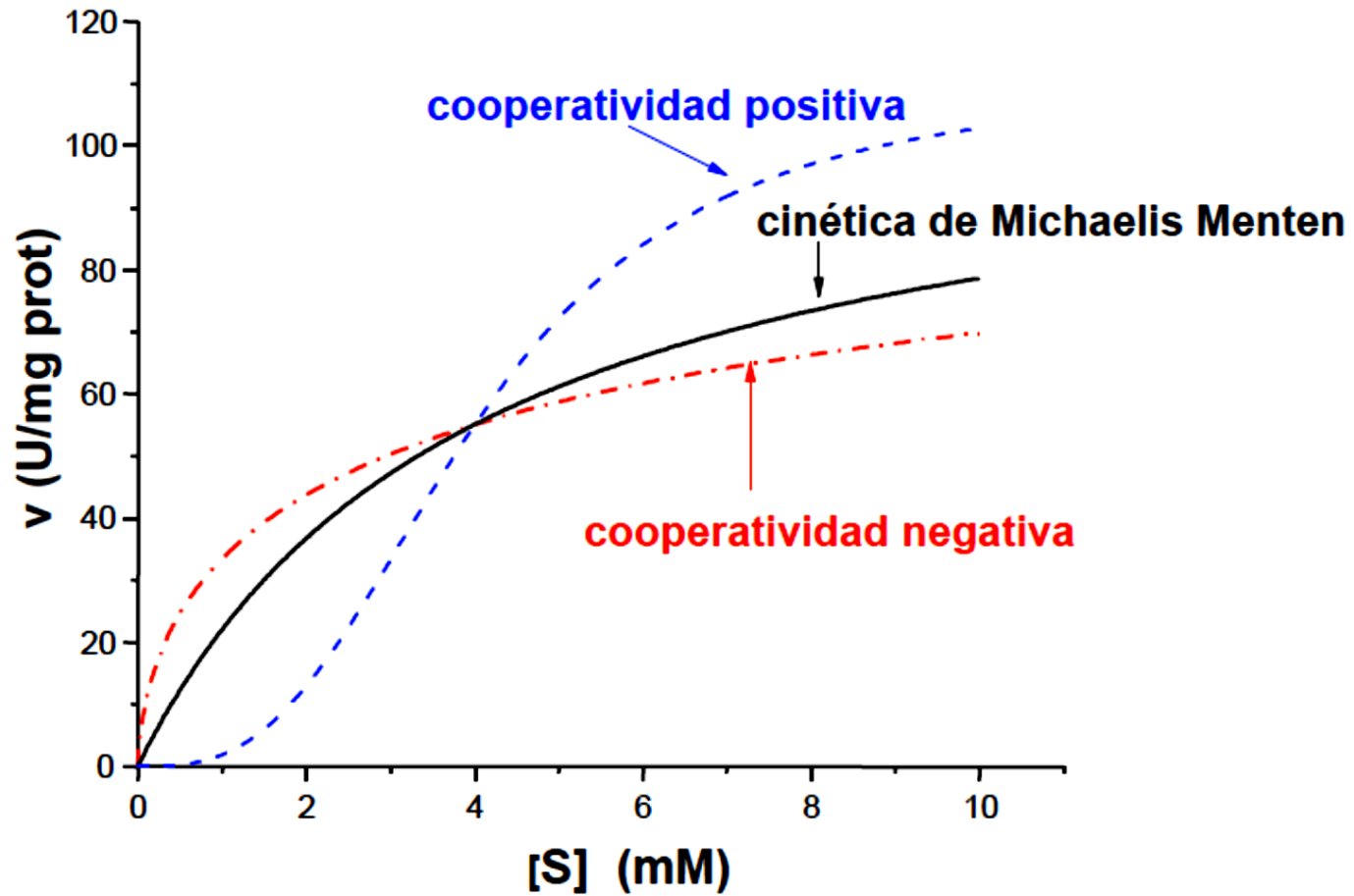


Cinéticas no Michaelianas

- Hay enzimas que no siguen el mecanismo propuesto por Michaelis-Menten
- Esto ocurre con los **enzimas alostéricos**, cuya gráfica v frente a $[S]$ no es una hipérbola, sino una sigmoide
- En la **cinética sigmoidea**, pequeñas variaciones en la $[S]$ en una zona crítica (cercana a la K_M) se traduce en grandes variaciones en la velocidad de reacción
- En general son ENZIMAS MULTIMERICAS con más de un sitio activo presentando un efecto cooperativo (la unión de la primera molécula de S o de un activador alostérico incrementa la actividad de la otra subunidad por el mismo S



Cinéticas no Michaelianas



Resumen

- La mayoría de las enzimas presentan ciertas propiedades cinéticas comunes. Cuando se agrega sustrato a una enzima, la reacción alcanza rápidamente un estado estacionario.
- A medida que aumenta $[S]$, la actividad enzimática en el estado estacionario aumenta de forma hiperbólica hasta alcanzar la velocidad máxima, $V_{\max}$ (toda la enzima forma el complejo ES).
- La constante de Michaelis (K_m) se define como la concentración de sustrato a la que la velocidad de la reacción es igual a la mitad de $V_{\max}$ ($v_0 = \frac{1}{2} V_{\max}$).
- K_m es una característica de cada enzima sobre un sustrato determinado.
- La ecuación de Michaelis-Menten relaciona la velocidad inicial con $[S]$ y $V_{\max}$ a través de la constante K_m .

Resumen

- La relación k_{cat}/K_m proporciona una buena medida de la eficiencia catalítica,
- Cada enzima tiene un pH óptimo (o rango de pH) en el que presenta actividad máxima.
- Las enzimas pueden disminuir su actividad por la acción de moléculas que actúan como inhibidores.
- La inhibición puede ser reversible (competitiva, no competitiva y mixta), lo que modifica K_m y/o V_{max} .
- En la inhibición irreversible, un inhibidor se une permanentemente a un sitio activo formando un enlace covalente o una interacción no covalente muy estable
- Hay enzimas que no siguen una cinética Michaeliana, conocidas como enzimas alostéricas